

**Epimerisierungsdomänen aus Peptidsynthetasen –  
Untersuchungen zur Substratspezifität und zur  
Interaktion mit anderen Domänen**

Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Chemie  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

**Uwe Linne**  
aus Marburg/Lahn

Marburg/Lahn 2001

Vom Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg  
Als Dissertation am 07.09. 2001 angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. M. A. Marahiel  
Zweitgutachter: Prof. Dr. T. Schrader

Tag der Disputation am 08. Oktober 2001

## Zusammenfassung

Die nichtribosomale Peptidbiosynthese wird durch multifunktionelle Peptidsynthetasen katalysiert, die eine modulare Struktur aufweisen. Diese Module lassen sich weiter unterteilen in Domänen, wobei jeder Domäne jeweils eine katalytische Funktion zukommt. Die Anzahl der Module und ihre jeweilige Domänenzusammensetzung definiert so die Aminosäuresequenz und die Struktur der Produkte. Die Adenylierungsdomänen (A-Domänen) erkennen und adenylieren die Substrataminosäuren. Danach werden die Aminoacylderivate unter AMP-Freisetzung als Thioester an einen Phosphopantetheinkofaktor (Ppant) gebunden, der seinerseits mit der Seitenkette eines invarianten Serins eines Peptidyl-Carrier-Proteins (PCP; T-Domäne) kovalent verknüpft ist. Kondensationsdomänen (C-Domänen) katalysieren die Peptidbindungsbildung. Neben diesen zur Elongation essentiellen Domänen (C-A-PCP) gibt es optionale Modifikationsdomänen, zu denen u.a. Epimerisierungsdomänen (E-Domänen) gehören, die die L-nach-D und D-nach-L Umwandlung der als Thioester gebundenen Substrate katalysieren.

Im Vordergrund dieser Arbeit standen Untersuchungen zur Spezifität von E-Domänen aus Peptidsynthetasen sowie ihrer Wechselwirkung mit anderen Domänen. Es zeigte sich, dass verkürzte Substratanaloga, sogenannte SNACs, nicht von E-Domänen umgesetzt werden. Daraufhin wurden auf genetischer Ebene Fusionsproteine der Typen A/PCP-E und A-PCP/E hergestellt („/“ gibt dabei die Fusionsstelle an), die jeweils die E-Domäne von TycA und A-Domänen anderer Module enthielten. Es zeigte sich, dass die E-Domäne von TycA, deren natürliches Substrat L-Phe-S-Ppant ist, dazu in der Lage war, mit verminderter Effizienz auch die alternativen Substrate Trp-S-Ppant, Val-S-Ppant und Ile-S-Ppant umzusetzen. Interessanterweise waren aber nur die Fusionsproteine epimerisierungsaktiv, welche ein PCP enthielten, das natürlicherweise mit einer E-Domäne interagiert (PCP<sup>E</sup>). Solche mit PCPs, welche natürlicherweise C-terminal mit einer C-Domäne, anstatt mit einer E-Domäne verknüpft sind (PCP<sup>C</sup>), waren inaktiv. Durch Sequenzvergleiche konnten konservierte Sequenzvariationen von PCP<sup>E</sup>s und PCP<sup>C</sup>s definiert werden. Der Einfluss der Sequenzunterschiede im CoreT (Bereich, in dem sich zentral das invariante Serin zur Kofaktorbindung befindet) auf die Epimerisierungsreaktion konnte darüber hinaus anhand von Mutanten biochemisch belegt werden. Als wichtiges Ergebnis kann festgehalten werden, dass E-Domänen mit den N-terminalen PCPs kommunizieren und für ihre Aktivität ein PCP<sup>E</sup> benötigen.

In der Literatur werden zwei Typen von E-Domänen diskutiert. Dies sind E-Domänen von Initiationsmodulen, die ein aminoacyl-S-Ppant Substrat epimerisieren und solche von Elongationsmodulen, die peptidyl-S-Ppant Substrate epimerisieren, nachdem die wachsende Peptidkette auf das entsprechende Modul übertragen wurde. Durch die Entwicklung eines *in vitro* Systems konnte gezeigt werden, dass diese peptidyl-E-Domänen prinzipiell dazu in der Lage sind aminoacyl-S-Ppant Substrate zu epimerisieren, wenn auch mit geringerer Effizienz. Das Vorhandensein einer N-terminalen C-Domäne hingegen hatte nicht nur den Verlust der aminoacyl-S-Ppant Epimerisierungsaktivität sondern auch den der Initiationsfähigkeit des Moduls zur Folge. Daraus konnte ein Modell abgeleitet werden, welches fundamental zum Verständnis der gerichteten Peptidsynthese durch Peptidsynthetasen beiträgt und erklärt, warum bei NRPS keine interne Mis-Initiation beobachtet werden kann. Hierbei wird das aminoacyl-S-Ppant Substrat von einer Akzeptorstelle der C-Domäne, die eine ausgeprägte Substratselektivität zu besitzen scheint, gebunden, bis die Peptidbindungsbildung mit dem elektrophilen Donorsubstrat vollzogen wurde. Das gebildete peptidyl-S-Ppant ist dann nicht länger ein Substrat dieser Akzeptorstelle, wird freigesetzt und kann mit einer optionalen E-Domäne oder aber mit der nachfolgenden C-Domäne interagieren.





# Inhaltsverzeichnis

<b>1 ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE</b>	<b>1</b>
<b>2 EINLEITUNG</b>	<b>5</b>
2.1 Struktur und Bedeutung nichtribosomal synthetisierter Polypeptide	5
2.2 Die nichtribosomale Peptidsynthese in Bakterien und Pilzen	8
2.3 Die Funktionen der einzelnen Domänen	11
2.3.1 Die Adenylierungsdomäne	12
2.3.2 Das Peptidyl-Carrier-Protein (Thiolierungsdomäne) und die posttranslationale Modifikation	13
2.3.3 Die Kondensationsdomäne	15
2.3.4 Die Heterozyklisierungsdomäne	17
2.3.5 Terminationsdomänen	18
2.3.6 Optionale Modifikationsdomänen	19
2.3.6.1 Die Epimerisierungsdomäne	20
2.3.6.2 Die N-Methylierungsdomäne	21
2.3.6.3 Weitere Modifikationsdomänen- Oxidations- und N-Formylierungsdomänen	21
2.4 Die Biosynthese von D-Aminosäuren	22
2.5 Die Inkorporation von D-Aminosäuren in nichtribosomal synthetisierte Peptide	24
2.6 Aufgabenstellung	25
<b>3 MATERIAL</b>	<b>26</b>
3.1 Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterial	26
3.2 Geräte	28
3.3 Vektoren	29
3.3.1 pQE60 und pQE70	29
3.3.2 pREP4	29

<b>3.4 Mikroorganismen</b>	<b>30</b>
3.4.1 E. coli XL1-Blue	30
3.4.2 E. coli M15	30
3.4.3 E. coli SG13009	30
<b>3.5 Medien</b>	<b>30</b>
<b>4 METHODEN</b>	<b>32</b>
<b>4.1 Molekularbiologische Methoden – DNA Techniken</b>	<b>32</b>
4.1.1 PCR-Amplifikation von DNA-Fragmenten	32
4.1.2 Gezielte Punktmutagenese	33
4.1.3 DNA-Sequenzanalyse	33
<b>4.2 Genexpression und Protein-Techniken</b>	<b>34</b>
4.2.1 Genexpression	34
4.2.2 Zellaufschluß – Präparation von E. coli Rohzelleextrakten	34
4.2.3 Proteinaufreinigung mittels IMAC - Affinitätschromatographie	35
4.2.4 Sequenzvergleiche von PCP <sup>E</sup> s mit PCP <sup>C</sup> s	36
<b>4.3 Biochemische Untersuchungen</b>	<b>36</b>
4.3.1 Assay für die Aktivität der A-Domäne -"ATP-PP <sub>i</sub> -Austausch"	36
4.3.2 Assay für die Aktivität des PCPs – Aminoacylierungsassay	37
4.3.3 Radioassay für den Nachweis der Elongationsreaktion und der Produktabspaltung im System TycB <sub>2-3</sub> /TycC <sub>1</sub>	38
4.3.4 Produktbildungsassay im System TycB <sub>2-3</sub> /TycC <sub>1</sub>	39
4.3.5 DKP-Bildungsassay	40
4.3.6 Epimerisierungsassay	41
4.3.7 SNAC-Epimerisierungsassay	42
<b>5 ERGEBNISSE</b>	<b>44</b>
<b>5.1 SNAC-Epimerisierungsassays</b>	<b>44</b>
<b>5.2 Konstruktion eines Sets aus acht Hybridproteinen des Typs A-PCP/E und A/PCP-E</b>	<b>45</b>

5.2.1 Erzeugung und Reinigung der rekombinanten Enzyme	45
5.2.2 Aminosäureaktivierung (PP <sub>i</sub> -Austausch)	47
5.2.3 Untersuchung der Zeitabhängigkeit der Aminoacylierung	49
5.2.4 Epimerisierungsaktivitäten der Fusionsproteine	51
5.2.5 Vergleich der Epimerisierungsaktivitäten von TycA (V), TycB <sub>3</sub> (XIV), TycA-AT-TycB <sub>3</sub> -E (XVII) und TycB <sub>3</sub> -AT/E (IIb)	54
5.2.6 Weitere Fusionsproteine des Typs A/PCP-E	56
<b>5.3 Der Einfluss der PCPs auf die Epimerisierung – PCP<sup>E</sup>s versus PCP<sup>C</sup>s</b>	<b>56</b>
5.3.1 Sequenzvergleiche verschiedener PCPs	56
5.3.2 Einfluss von Mutationen im CoreT von PCPs auf die Epimerisierungsaktivität	58
5.3.3 DKP-Bildungsaktivität der GrsA-CoreT-Mutanten verglichen mit dem Wildtyp	60
5.3.4 Mutationen in TycB <sub>2</sub> -AT/E (Ib)	62
<b>5.4 Entwicklung eines <i>in vitro</i> Systems zur Charakterisierung einer peptidyl-Epimerisierungsdomäne</b>	<b>63</b>
5.4.1 Konstruktion und Reinigung der rekombinanten Enzyme	64
5.4.2 Aminosäureaktivierung (PP <sub>i</sub> -Austausch)	65
5.4.3 Untersuchung der Aminoacylierungskinetiken sowie des Phe-Transfers von den TycB-Derivaten auf TycC	66
5.4.4 Produkt Identifizierung und Quantifizierung mittels HPLC-MS	68
5.4.5 Epimerisierungsaktivitäten der TycB-Derivate XI, XII, XIII und XIV	71
5.4.6 Epimerisierungsaktivität von TycB <sub>2-3</sub> -AT.CAT/E (XXV)	73
<b>5.5 Elongationsversuche und Protein-Protein-Erkennung im Tyrocidin-Biosynthesystem über die Epimerisierungsdomänen</b>	<b>74</b>
<b>6 DISKUSSION</b>	<b>77</b>
<b>6.1 Motivation für diese Arbeit</b>	<b>77</b>
<b>6.2 Substratspezifität von E-Domänen</b>	<b>78</b>
6.2.1 Externe Variation der Substrate	78
6.2.2 Fusionsproteine – Änderung der Spezifität durch Austausch der A-Domänen	79
<b>6.3 Der Einfluss der PCPs auf die Epimerisierung – PCP<sup>E</sup>s versus PCP<sup>C</sup>s</b>	<b>81</b>

6.3.1 Selektivität von E-Domänen und ihre Kommunikation mit dem PCP <sup>E</sup>	81
6.3.2 Die Auswirkung von Mutationen im PCP auf die Epimerisierungs- und Produktbildungsaktivität	82
6.3.3 Das L/D-Gleichgewicht und der Einfluss der PCPs	85
<b>6.4 Entwicklung eines <i>in vitro</i> Systems zur Charakterisierung einer Peptidyl-Epimerisierungsdomäne</b>	<b>86</b>
6.4.1 Die Auswahl eines geeigneten Systems	86
6.4.2 Die C-Domäne verhindert Mis-Initiation und legt den Zeitpunkt der Epimerisierung fest	88
<b>6.5 Aminoacyl- versus peptidyl-E-Domäne</b>	<b>93</b>
6.5.1 Gibt es zwei Klassen von E-Domänen ?	93
6.5.2 Mögliche mechanistische Unterschiede – ein Modell für die abweichende Reaktivität	94
<b>6.6 Protein-Protein-Erkennung und kombinatorische Ansätze zur Erzeugung neuer Produkte</b>	<b>95</b>
6.6.1 Die in trans Protein-Protein-Interaktion zweier NRPSs	95
6.6.2 Kombinatorik mit NRPS-Modulen und Domänen – ein langfristiges Ziel mit vielen Hindernissen	97
<b>7 ANHANG</b>	<b>100</b>
<b>Anhang A – Proteinübersicht</b>	<b>100</b>
<b>Anhang B – Herkunft und Klonierung aller verwendeten Proteine</b>	<b>102</b>
Beschreibung der Konstrukte K1-K11:	104
Beschreibung der Plasmide, die für die in dieser Arbeit erwähnten Proteine kodieren	105
<b>Anhang C – Core-Sequenzen von NRPS-Domänen</b>	<b>109</b>
<b>Anhang D – Abbildungsverzeichnis</b>	<b>110</b>
<b>8 LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>112</b>

# 1 Abkürzungen und Symbole

Tabelle 0-1 Verwendete Abkürzungen:

aminoacyl-S-Ppant	an das invariante Serin des PCP's gebundener Kofaktor Ppant, der über einen Thioester aminoacyliert ist
A-Domäne	Adenylierungsdomäne
Amp	Ampicillin
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
<i>bla</i>	$\beta$ -Lactamase-Gen
bp	Basenpaare
<i>cat</i>	Chloramphenicol-Acetyltransferase-Gen
C-Domäne	Kondensationsdomäne
Ci	Curie
CoASH	Coenzym A
cpm	gezählte Zerfälle pro Minute ( <i>counts per minute</i> )
Da	Dalton
DC	Dünnschichtchromatographie
$DH_2O$	entionisiertes Wasser
DKP	ohne Zusatz in dieser Arbeit immer D-Phe-L-Pro-Diketopiperazin
DNA	Desoxyribonucleinsäure ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
dpm	korrigierte Zerfälle pro Minute ( <i>desintegrations per minute</i> )
DTE	1,4-Dithioerythritol
E-Domäne	Epimerisierungsdomäne
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESI	Elektrospray-Ionisation
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FPLC	schnelle Flüssigchromatographie ( <i>fast performance liquid chromatography</i> )

HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie ( <i>high performance liquid chromatography</i> )
KOH	Kaliumhydroxid
LSC	Flüssigkeits-Szintillations-Zählung ( <i>liquid scintillation counting</i> )
IMAC	Affinitätschromatographie an immobilisierten Metallionen ( <i>Immobilized metal affinity chromatography</i> )
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktosid
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
LC	Flüssigchromatographie ( <i>liquid chromatography</i> )
MCS	Multipler Klonierungsbereich ( <i>multiple cloning site</i> )
M-Domäne	Methylierungsdomäne
min	Minute(n)
MS	Massenspektrometrie ( <i>mass spectrometry</i> )
NRPS	<u>N</u> ichtribosomale- <u>P</u> eptidsynthetasen
NTA	Nitrilotriacetat
OD $\lambda$	optische Dichte bei der Wellenlänge $\lambda$ [nm]
ORF	offenes Leseraster (engl. <i>open reading frame</i> )
<i>ori</i>	Replikationsursprung ( <i>origin of replication</i> )
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCP	<u>P</u> eptidyl- <u>C</u> arrier- <u>P</u> rotein (s. auch T-Domäne)
PCP <sup>C</sup>	PCP, welches am C-Terminus mit einer Kondensationsdomäne verbunden ist
PCP <sup>E</sup>	PCP, welches am C-Terminus mit einer Epimerisierungsdomäne verbunden ist
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
peptidyl-S-Ppant	an das invariante Serin des PCP's gebundener Kofaktor Ppant, der über einen Thioester mit einem Peptid derivatisiert ist
PKS	<u>P</u> oly <u>k</u> etidsynthetasen
Ppant	4'-Phosphopantethein

PP <sub>i</sub>	anorganisches Pyrophosphat ( <i>inorganic pyrophosphate</i> )
RBS	ribosomale Bindestelle ( <i>ribosomal binding site</i> )
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
[Aminosäure]-SNAC	Aminosäurederivate, die als Thioester an die Thiolgruppe von N-Acetylcysteamin gebunden sind
TCA	Trichloressigsäure (engl. <i>tri-chloro-acetic acid</i> )
T-Domäne	Thiolierungsdomäne (s. auch PCP)
Te-Domäne	Thioesterasedomäne
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
V/v	Volumen pro Volumen (engl. <i>volume per volume</i> )
W/v	Gewicht pro Volumen (engl. <i>weight per volume</i> )

**Tabelle 0-2 Aminosäuren:** Abkürzungen und Molekulargewichte

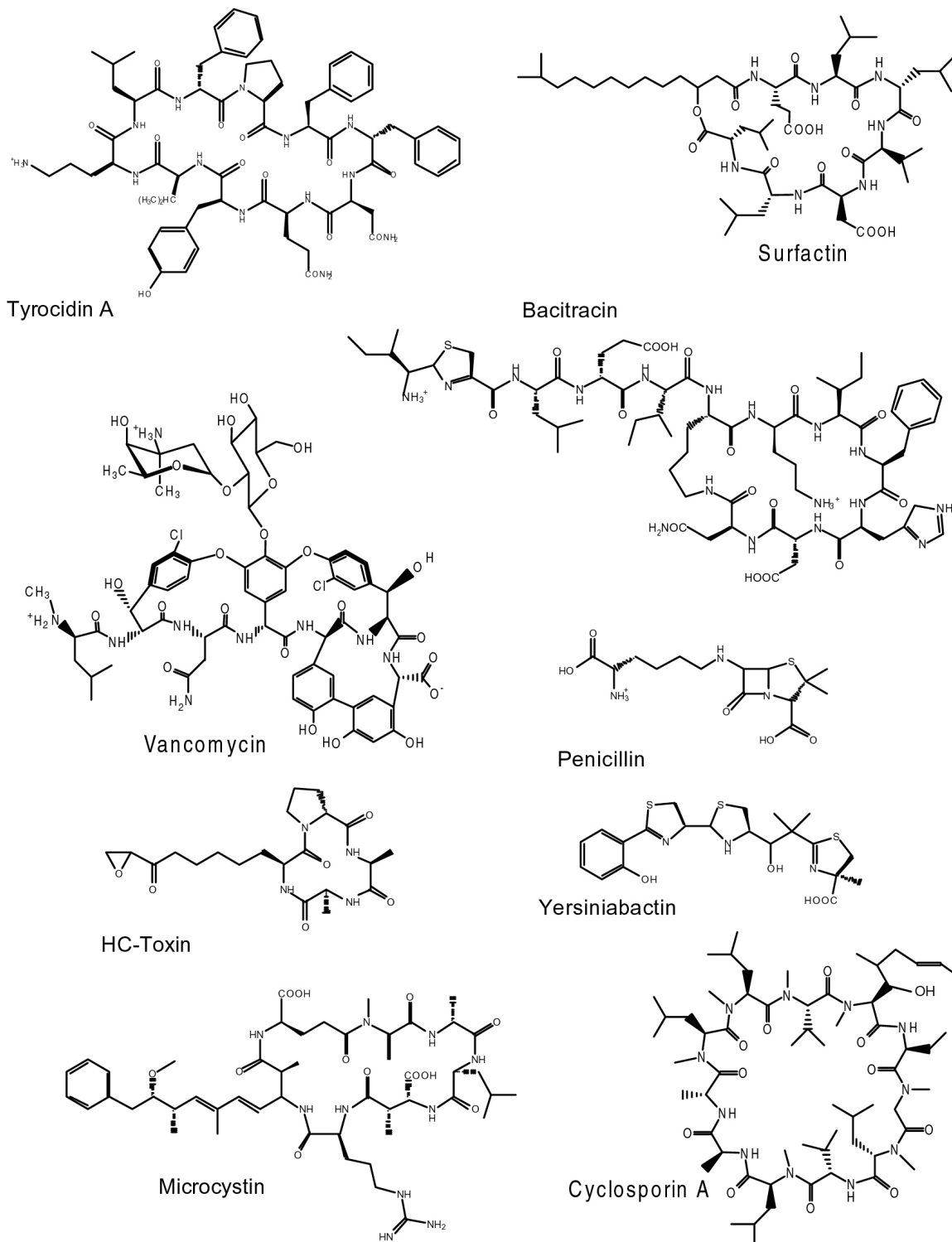
<b>Aminosäure</b>	<b>3-</b>	<b>1-</b>	<b>MW [g·mol<sup>-1</sup>]</b>
	<b>Buchstabenkode</b>		
Alanin	Ala	A	89
Arginin	Arg	R	174
Asparagin	Asn	N	132
Asparaginsäure	Asp	D	133
Cystein	Cys	C	121
Glutamin	Gln	Q	146
Glutaminsäure	Glu	E	147
Gln oder Glu	Glx	Z	-
Glycin	Gly	G	75
Histidin	His	H	155
Isoleucin	Ile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



## 2 Einleitung

### 2.1 Struktur und Bedeutung nichtribosomal synthetisierter Polypeptide

In Bakterien und Pilzen findet man eine große Bandbreite verschiedener außergewöhnlicher Sekundärmetabolite, darunter auch Polypeptide, die oftmals eine zyklische Struktur besitzen und eine große Anzahl nicht proteinogener Aminosäuren und Hydroxysäuren enthalten können (siehe einige ausgewählte Beispiele in Abbildung. 2-1) [1, 2]. Umfangreiche weitere Modifikationen wie  $\alpha$ -C-Epimerisierung (D-Aminosäuren), N-Methylierung, N-Formylierung, Heterozyklisierungen, sowie  $\beta$ -,  $\chi$ - und  $\delta$ -verknüpfte Peptidbindungen sind ebenfalls möglich [3]. Die strukturelle Vielfalt wird noch weiter vergrößert durch nachträgliche Modifikationen der Peptide, wie zum Beispiel Glykosilierungen oder Hydroxylierungen [4]. Generell lässt sich sagen, dass diese Polypeptide aufgrund ihrer strukturellen Vielfalt ein pharmakologisch sehr breites Wirkungsspektrum zeigen. So findet man Peptidantibiotika, Immunsuppressiva und Zytostatika unter ihnen. Einige dieser Stoffe haben eine so große Bedeutung erlangt, dass sie aus der modernen Medizin nicht mehr wegzudenken sind. Bei dieser Stoffklasse handelt es sich um Sekundärmetabolite der produzierenden Organismen, die nichtribosomal an enzymatischen Templaten, den Peptidsynthetasen (NRPS) [5, 6], synthetisiert werden. Insbesondere dem wachsenden Interesse an diesen Sekundärmetaboliten und Genomprojekten ist es zu verdanken, dass in letzter Zeit immer mehr Biosyntheseoperons identifiziert und analysiert werden. Peptidsynthetasegene bzw. deren Produkte kennt man insbesondere aus gram-positiven Bakterien des Genus *Bacillus*, einer großen Anzahl von Actinomyceten sowie aus einigen gram-negativen Proteobakterien [7-9]. Aber auch einige einzellige Pilze besitzen die Fähigkeit bestimmte Polypeptide nichtribosomal herzustellen [10]. Hier wäre insbesondere *Penicillium chrysogenum* zu nennen, ein Penicillin-Produzent [11]. Die 1928 von A. Fleming zufällig gemachte Entdeckung des Penicillins hat die moderne Infektionsmedizin im 20. Jahrhundert entscheidend geprägt. Die nichtribosomal synthetisierten Penicilline [12, 13] und Cephalosporine [11, 14] bilden noch heute die Basis bei der Bekämpfung von Infektionskrankheiten. Weitere pharmakologisch äußerst bedeutsame Produkte nichtribosomaler Peptidsynthese sind das zyklische Undecapeptid Cyclosporin (*Tolypocladium niveum*) [25], welches als Immunsuppressivum bei Organtransplantationen die Abstoßung der Spenderorgane unterdrückt, sowie Vancomycin [4], welches häufig bei



**Abbildung 2-1: Beispiele für die strukturelle Vielfalt von Produkten der nichtribosomalen Peptidsynthese**

Vancomycin, Penicillin, Tyrocidin und Bacitracin sind Peptidantibiotika [4, 12, 15, 16]. Surfactin hat Biotensideigenschaften [17, 18], Cyclosporin wird als Immunsuppressivum bei verwendet [19]. Yersiniabactin ist ein Siderophor und essentiell für die Pathogenität des Pesterregers *Yersinia pestis* [20], während HC-Toxin [21, 22] ein Phytotoxin und Microcystin ein Heptatoxin ist [23, 24].

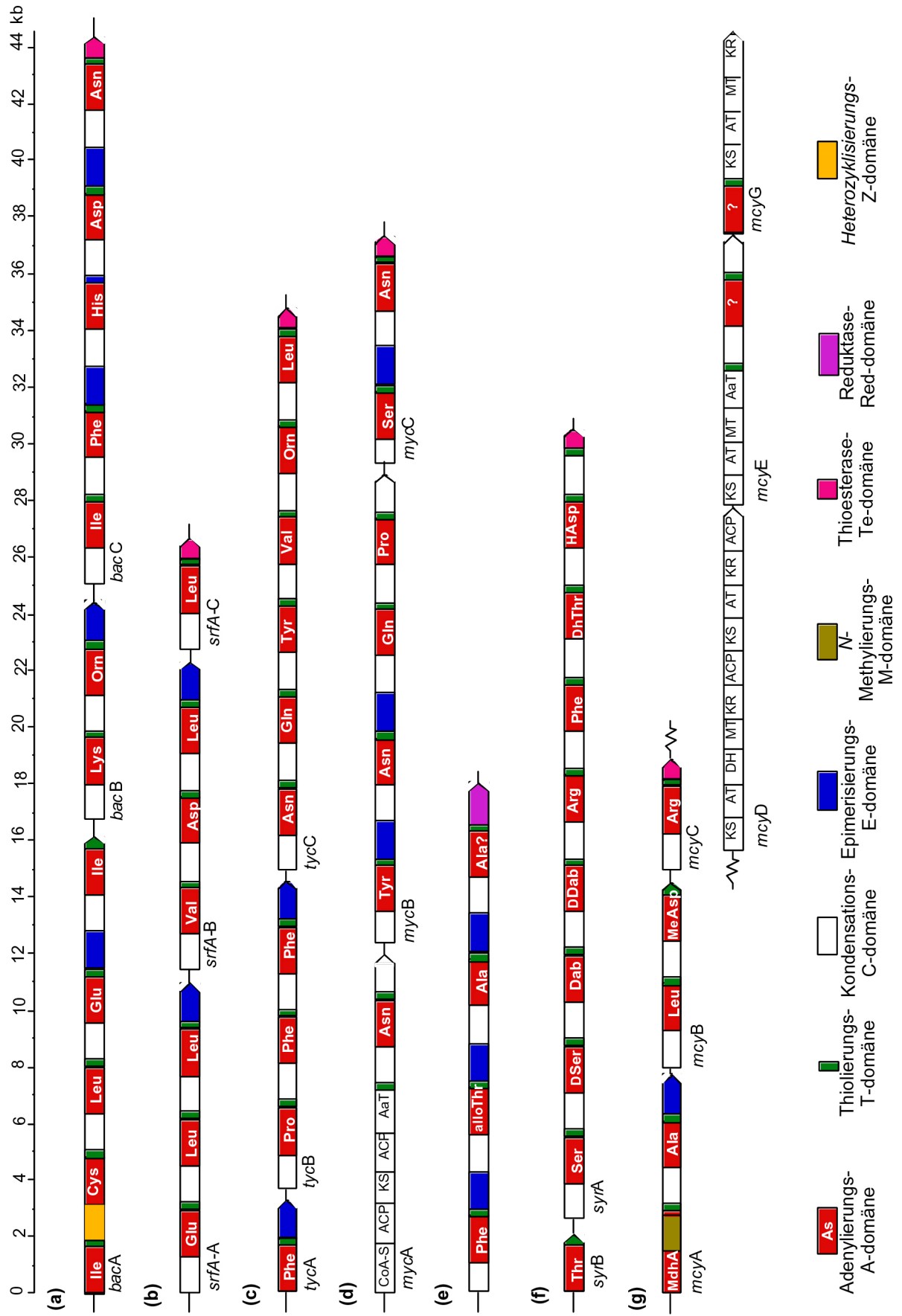
Infektionen mit sogenannten MDR-Stämmen (Multi-Drug-Resistent) das einzig noch wirksame Antibiotikum darstellt. Insbesondere auch gemischte Produkte, die sowohl einen Polypeptidanteil als auch Polyketidstrukturen in sich vereinen [26], rücken aufgrund ihrer immensen pharmakologischen Bedeutung immer mehr in den Mittelpunkt des Interesses. Wichtige Vertreter dieser letztgenannten Stoffklasse sind Epothilon [27] und Bleomycin [28], hochwirksame Antitumor-Wirkstoffe.

Man findet aber nicht nur pharmakologisch nützliche, sondern auch toxische Produkte. Viele nichtribosomal synthetisierte Produkte pilzlichen Ursprungs verursachen durch ihre Toxizität für Nutzpflanzen beträchtlichen Schaden [21, 29]. Die Heptatoxine des Cyanobakteriums *Microcystis aeruginosa* [23, 30, 31] sind als toxische Produkte in eutrophierten Gewässern zu finden.

Der Aufwand, den die Mikroorganismen zur nichtribosomalen Peptidsynthese betreiben, ist immens, bedenkt man die Größe der NRPS. Die Cyclosporin-Synthetase ist mit 1.69 MDa das bisher größte bekannte Enzym. Die Biosyntheseoperons machen oftmals einen beachtlichen Teil der genomischen bakteriellen DNA aus (in *Bacillus subtilis* ~4%). Aber so pharmakologisch interessant die strukturell sehr divergente Gruppe nichtribosomal synthetisierter Peptide ist, so wenig weiß man über ihre physiologische Rolle in den produzierenden Organismen [32, 33]. Betrachtet man die antibiotischen Eigenschaften dieser Stoffklasse [1], so lässt sich vermuten, dass sie den produzierenden Mikroorganismen einen Selektionsvorteil verschafft haben, indem Nahrungskonkurrenten am Wachstum gehindert wurden. Eine andere Spekulation legt regulatorische Funktionen nahe, insbesondere solche, die zu Zelldifferenzierungen führen [34]. Eine wieder andere Hypothese besagt, dass diese Stoffe die Funktion exogener Signalmoleküle übernehmen können [35]. Einige nichtribosomal synthetisierte Peptide sind  $\text{Fe}^{3+}$ -Chelatbildner, sogenannte Siderophore. Diese werden unter Eisenmangelbedingungen produziert und in den extrazellulären Raum sekretiert, wo sie hochwirksam  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen komplexieren. Dieser Komplex wird dann durch spezielle Transportsysteme in die Zellen zurückgeschleust, wo die  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen schließlich freigesetzt werden und den Mikroorganismen ein Überleben ermöglichen [36, 37]. Es ist bekannt, dass dieser Mechanismus essentiell für die Pathogenität bestimmter Mikroorganismen, so die des Pesterregers *Yersinia pestis* [38, 39], des Choleraerregers *Vibrio cholerae* [40-43] und des Tuberkuloseerregers *Mycobacterium tuberculosis* [44, 45] ist.

## 2.2 Die nichtribosomale Peptidsynthese in Bakterien und Pilzen

Nichtribosomale Peptidsynthetasen (NRPS) sind Multienzyme mit einem modularen Aufbau (siehe Abbildung 2-3) [1] ähnlich dem der Polyketidsynthetasen [46]. Beispiele für die Organisation einiger Biosyntheseoperons zeigt Abbildung 2-2. Jedes Modul ist mit allen katalytischen Einheiten, den sogenannten Domänen, ausgestattet, die angefangen von der Aktivierung der Substrate über optionale Modifikationen bis hin zu deren Einbau in das jeweilige Produkt notwendig sind. Die Substrate werden erkannt und unter ATP Hydrolyse als Aminoacyladenylat aktiviert (Adenylierungsdomäne; A-Domäne) [47, 48]. Nachfolgend wird das aktivierte Aminoacyladenylat unter AMP Abspaltung als Thioester auf einen 4'-Phosphopanthetin-Kofaktor (Ppant) des zum Modul gehörenden Peptidyl-Carrier-Proteins (Thiolierungsdomäne; PCP oder T-Domäne) übertragen [49, 50]. Die eigentliche Produktsynthese findet also mit auf diesen PCPs gebundenen Substraten statt, so dass für den Einbau eines Bausteins in das Endprodukt genau ein PCP notwendig ist. Dieses „Multiple-Carrier-Thiotemplat“-Modell [10, 51], was direkt nach der Entdeckung der PCPs postuliert wurde, ist heute allgemein anerkannt. Für die katalysierte Peptidbindungsbildung schließlich ist die Kondensationsdomäne (C-Domäne) verantwortlich [52]. Ein solches aus drei Domänen bestehendes Modul (C-A-PCP), welches die Aktivierung, die Bindung an das Enzymtemplatt sowie die Kondensation mit einem elektrophilen Donor-(aminoacyl- oder peptidyl-)S-Ppant Substrat katalysiert, bezeichnet man als minimales Elongationsmodul. Bei einem Initiationsmodul (A-PCP), welches dazu in der Lage ist, eine als Thioester gebundene Aminosäure auf ein Elongationsmodul zu übertragen und damit die Produktsynthese zu starten, fehlt in der Regel die N-terminale C-Domäne. Ein Terminationsmodul (C-A-PCP-Te) besitzt zusätzlich C-terminal von dem PCP eine Terminationsdomäne (z.B. eine Thioesterasedomäne), die die Produktabspaltung vom Enzymtemplatt katalysiert. Die Abfolge der Module ist kolinear mit der Aminosäureabfolge in den jeweiligen Endprodukten, so dass in der Regel je eingebauter Aminosäure im Produkt ein Modul (die Größe beträgt ca. 1000 Aminosäuren für ein Minimalmodul) benötigt wird [1]. Die Kondensation schreitet stufenweise vom Initiationsmodul über eine variable Anzahl von Elongationsmodulen voran, wobei sich die um eine Aminosäure verlängerte Peptidylkette nach erfolgter Kondensation jeweils auf dem nächsten „downstream“ PCP befindet. Ist die Peptidkette schließlich auf dem PCP des Terminationsmoduls gebunden, so wird das nunmehr fertige Endprodukt, gegebenenfalls unter Zyklisierung, vom Enzym-Templatt abgespalten. Diese Reaktionsabfolge ist für das Beispiel der Tyrocidin-Biosynthese [15] beispielhaft in Abbildung 2-3 dargestellt,



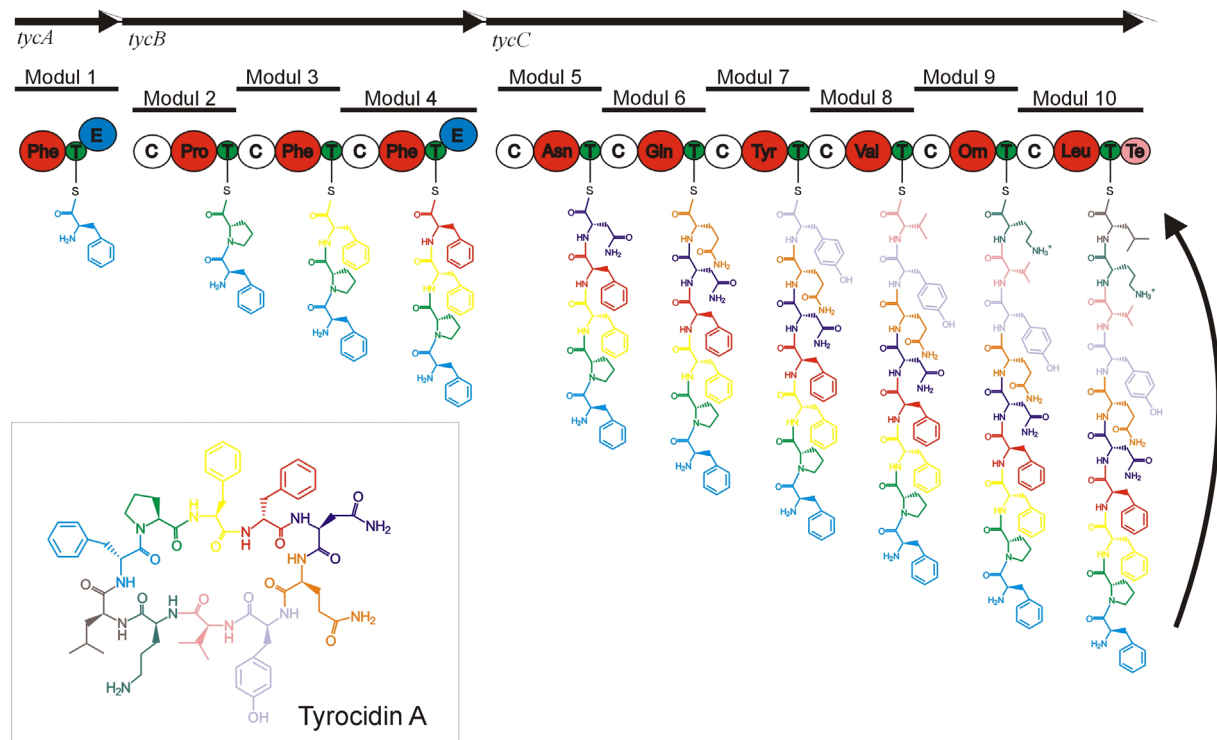
**Abbildung 2-2 (vorherige Seite): Schematische Darstellung der für einige Peptidsynthetasen kodierenden Gene**

(a) Gene der Bacitracin Synthetasen A-C aus *Bacillus licheniformis* ATCC 10716 [16], (b) Gene der Surfactin A Synthetasen A-C aus *Bacillus subtilis* ATCC 21332 [18], (c) Gene der Tyrocidin Synthetasen A-C aus *Bacillus brevis* ATCC 8185 [15], (d) Gene der Mycosubtilin Synthetasen A-C aus *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (Myc A ist ein natürliches Hybrid, welches aus Teilen einer Fettsäuresynthase, einer Aminotransferase sowie NRPS-Bestandteilen besteht) [53], (e) Gen der Glycolipopetidsynthetase aus *Mycobacterium smegmatis* MC 2155 [54], (f) Gene der Syringomycin Synthetasen aus *Pseudomonas syringae* [55], (g) Gene der Microcystin Synthetasen A-E und G aus *Microcystis aeruginosa* (McyD ist eine Polyketidsynthase, McyE und McyG sind NRPS-PKS-Hybride. Interessanterweise sind die sechs Gene *mcyA-E* und G nicht Teil eines einzigen Operons) [30].  
Abkürzungen: alloThr, allo-Threonin; Dab, Diaminobuttersäure; DhThr, Dehydrothreonin; HAsp, 3-Hydroxyaspartat; MdhA, N-Methyldehydroalanin; MeAsp, 3-Methylaspartat; KS,  $\beta$ -Ketoacylsynthase; AT, Acyltransferase; DH,  $\beta$ -Hydroxyacyl-Dehydratase; MT, Methyltransferase; KR,  $\beta$ -Ketoacylreduktase; ACP, *acyl-carrier-protein*; AaT, Aminotransferase. Die Strukturen der zugehörigen Peptide von (a), (b), (c) und (g) sind in Abb. 2-1 dargestellt.

die auch das „Multiple-Carrier-Thiotemplat“-Modell [10, 51] veranschaulicht. Interessanterweise findet man immer nur ein Endprodukt einer definierten Länge und keine verkürzten Produkte, die auf eine falsche interne Initiation der Produktsynthese durch ein Elongationsmodul schließen ließen. Es muss also einen Mechanismus geben, der diese interne Mis-Initiation effizient unterbindet. Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, ist das Vorhandensein einer N-terminalen C-Domäne maßgeblich an der Vermeidung dieser internen Mis-Initiation beteiligt [56].

Die gezeigte modulare Architektur von NRPS führt zu beachtlichen Enzymgrößen. Die Module können dabei alle auf einer Polypeptidkette angeordnet sein (z.B. Cyclosporin-Synthetase aus *Tolypocladium niveum* [25]) oder aber auf mehreren kleineren Polypeptidketten vorliegen (z.B. Tyrocidin-Synthetasen aus *Bacillus brevis* [15]), die sich dann selektiv erkennen müssen. Erstere Variante findet man häufig bei den fungalen Systemen, letztere bei den bakteriellen. Ob die selektive Erkennung zweier Synthetasen nur über die spezifische Protein-Protein-Erkennung funktioniert [52, 57] oder ob weitere Mechanismen, wie z.B. eine Substratspezifität der C-Domänen, daran beteiligt sind, ist noch nicht endgültig geklärt. Bei den ebenfalls multimodular aufgebauten Polyketidsynthetasen wurde diese Funktion sogenannten Linkerbereichen von ca. 60 bis 70 Aminosäuren Länge zugeordnet [58]. Bei NRPS scheinen solche Bereiche, zumindest in dieser Länge, nicht zu existieren. Auffällig ist hierbei, dass am C-terminalen Ende bakterieller Synthetasen häufig Epimerisierungsdomänen zu finden sind. Es sind aber auch die Übergänge PCP  $\rightarrow$  C [16], A

→ PCP [28] und der ungewöhnliche Übergang C → A [23] bekannt (vergleiche Abbildung 2-2).



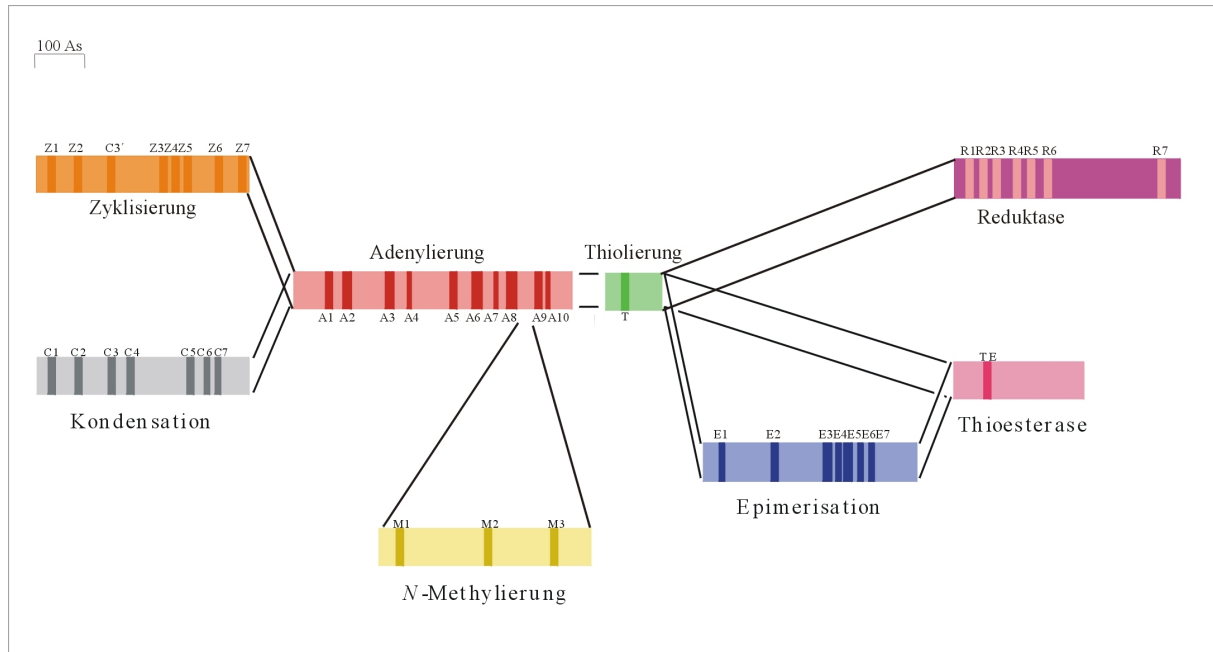
**Abbildung 2-3: Nichtribosomale Peptidsynthese schematisch dargestellt am Beispiel der Tyrocidin Synthetasen**

Für jede eingebaute Aminosäure ist ein Modul mit allen benötigten katalytischen Einheiten, den Domänen, vorhanden. Die Produktsynthese erfolgt auf dem Enzymtemplat („Multiple-Carrier-Thioemplant“-Modell). Die Reaktionsreihenfolge ist dabei durch die Modulordnung festgelegt, das heißt, ein Elongationsmodul kann nur ein peptidyl-Substrat an das nachfolgende Modul weitergeben, nicht jedoch ein aminoacyl-Substrat, welches direkt nach der Aminoacylierung der PCPs durch die A-Domänen als Intermediat entsteht. Die Mechanismen, die für diese strikte Einhaltung der Reaktionsabfolge verantwortlich sind, konnten im Rahmen dieser Arbeit aufgeklärt werden, was zum fundamentalen Verständnis der nichtribosomalen Peptidsynthese beigetragen hat [56].

### 2.3 Die Funktionen der einzelnen Domänen

Sequenzvergleiche von Peptidsynthetasen führten zur Identifizierung putativer katalytischer Einheiten [59], die man als Domänen bezeichnete [60] (siehe Abbildung 2-4). Die Gesamtheit der Domänen, die zum Einbau genau einer Aminosäure in das Endprodukt verantwortlich sind, wird als Modul bezeichnet. Neben den essentiellen Domänen, die zur Substraterkennung und Aktivierung (Adenylierungs-(A)-domäne), Substratbindung (Peptidyl-Carrier-Protein (PCP) oder Thiolierungs-(T)-domäne) und Peptidbindungsbildung (Kondensations-(C)-

domäne) verantwortlich sind, gibt es verschiedene optionale Domänen zur Substratmodifikation, die maßgeblich zur strukturellen Vielfalt und zur Wirksamkeit der nichtribosomal synthetisierten Peptide beitragen. Bekannt sind N-Methylierungs-(M)-



**Abbildung 2-4: Die wichtigsten Domänen von Peptidsynthetase-Modulen**

Das Schema zeigt die Größe, Position und Funktion der wichtigsten Domänen von Peptidsynthetase-Modulen. In den einzelnen Domänen ist die Position der in ihnen hoch konservierten Core-Sequenzen (siehe Anhang C) dunkel hervorgehoben. Das kleinste Modul, welches alle katalytischen Aktivitäten zur Verlängerung einer Peptidkette um eine Aminosäure enthält, besteht aus je einer C-, A- und PCP-Domäne (C-A-PCP) und wird als minimales Elongationsmodul bezeichnet.

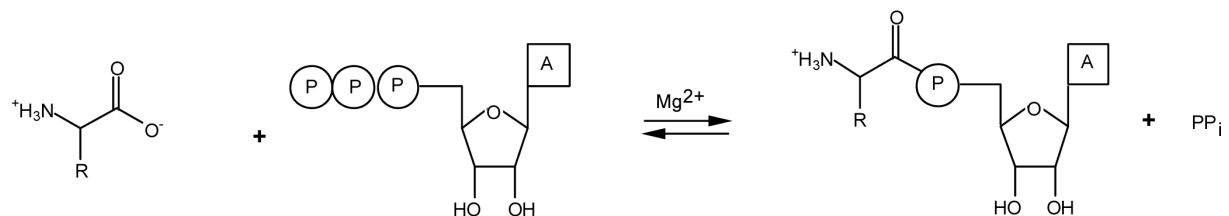
domänen, Epimerisierungs-(E)-domänen, sowie Heterozyklisierungs-(Cy)-domänen, die man häufig anstelle von C-Domänen findet wenn Cystein, Threonin oder Serin eingebaut werden. Die gebildeten zyklischen thiazolin- bzw. oxazolin-Strukturen können optional durch Oxidationsdomänen zu den entsprechenden Thiazol- bzw. Oxazolringen oxidiert werden. Module und Domänen lassen sich meist eigenständig in aktiver Form exprimieren [15, 49, 52]. Die Funktionen und katalytischen Aktivitäten der einzelnen Domänen sollen im folgenden genauer betrachtet werden.

### 2.3.1 Die Adenylierungsdomäne

Die ungefähr 550 Aminosäuren großen A-Domänen sind für die selektive Erkennung der Substrataminosäuren und deren reversible Aktivierung als Aminoacyladenylat zuständig. Für jedes eingebaute Substrat existiert in der Regel eine eigene A-Domäne. Die von ihnen



katalysierte Reaktion in der nichtribosomalen Peptidsynthese ist vergleichbar mit der der Aminoacyl-tRNA-Synthetasen in der ribosomalen Proteinbiosynthese. Wie die Aufklärung der Kristallstruktur der Phenylalanin aktivierenden A-Domäne „PheA“ zeigte, besitzen A-Domänen aber eine andere Faltung [61], die Strukturhomologien zu Acyl-CoA-Synthetasen und Luziferasen [59, 62], nicht aber zu Aminoacyl-tRNA-Synthetasen aufweist. Die Kristallstruktur zeigt dabei eine große N-terminale und eine kleinere C-terminale Untereinheit und erlaubte auch die Identifizierung einer Substratbindungstasche aus zehn Aminosäuren, was schließlich zur Entdeckung des „nichtribosomalen Codes“ führte [63]. Die Anordnung bestimmter Aminosäuren innerhalb dieser Bindungstasche bestimmt maßgeblich die Selektivität der A-Domäne, wobei aber auch Seitenspezifitäten beobachtet werden können, die zu Variationen im Endprodukt führen [15]. Solche Seitenspezifitäten wurden bei Aminoacyl-tRNA-Synthetasen nicht beobachtet.



#### Abbildung 2-5: Reversible Aktivierung der Substrataminosäuren

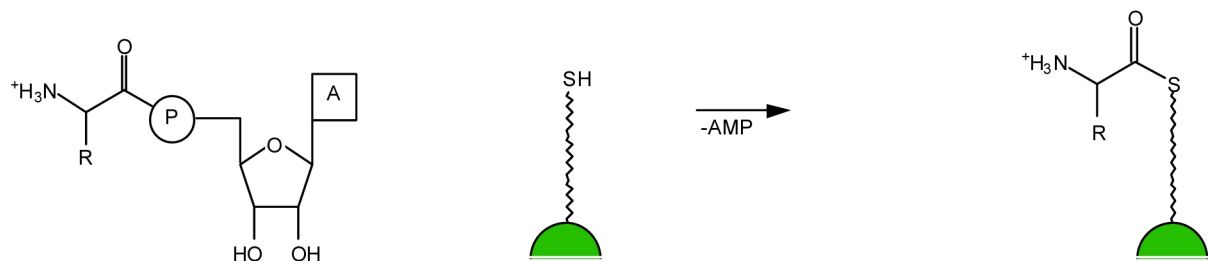
Die hier dargestellte und von den A-Domänen katalysierte Reaktion ist reversibel. Die Substrataminosäure wird unter Hydrolyse von  $Mg^{2+}$ -ATP in ein energiereiches Aminoacyladenylat überführt.

Die reversible Aktivierung der gebundenen Substrataminosäuren erfolgt durch die Bildung eines Aminoacyladenylates unter ATP-Hydrolyse und Freisetzung von anorganischem Pyrophosphat (siehe Abbildung 2-5) [64, 65]. In einem zweiten Schritt wird die aktivierte Substrataminosäure unter Ausbildung einer Thioesterbindung auf den 4'-Phosphopantetheinrest (Ppant) eines PCP's übertragen, wobei AMP abgespalten wird. Man bezeichnet dies als Zweistufenmechanismus [8, 48, 66] und kann Parallelen zu der ribosomalen Peptidbiosynthese ziehen, wo die Aminosäuren als Oxyester an tRNAs gebunden werden.

#### 2.3.2 Das Peptidyl-Carrier-Protein (Thiolierungsdomäne) und die posttranslationale Modifikation

Die Peptidyl-Carrier-Proteine (PCPs, auch als Thiolierungs-(T)-Domänen beschrieben) besitzen eine Größe von ca. 80 Aminosäuren und sind normalerweise immer direkt C-terminal

der A-Domänen lokalisiert. Sie dienen als Bindungsstellen für die Aminosäuren bzw. die Peptidylzwischenprodukte (siehe Abbildung 2-6) [49]. Hierbei werden die Substrate aber nicht direkt an einen Aminosäurerest des PCP's, sondern als Thioester an das 3'-Cysteamin-Ende eines 4'-Phosphopantetheins [51], welches seinerseits wiederum als Ester an das invariante Serin im CoreT (GG(HD)S(LI); vergleiche Anhang C) der PCPs gekoppelt ist, gebunden. Somit weisen PCPs mechanistische Homologien zu den ACPs aus der Fettsäure- [67] und Polyketidsynthese [68] auf. Eine Strukturaufklärung des PCP's von TycC<sub>3</sub> mittels der NMR-Technik zeigte kürzlich auch strukturelle Ähnlichkeiten zwischen ACPs und PCPs [50].



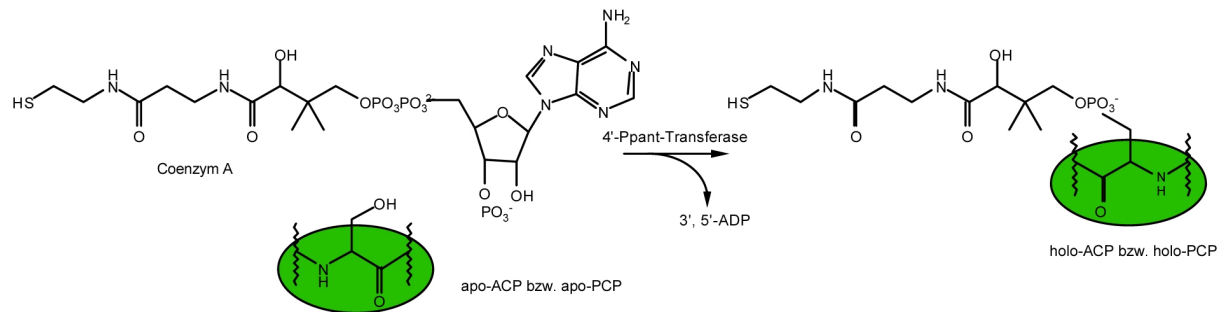
**Abbildung 2-6: Das Peptidyl-Carrier-Protein (PCP)**

Das PCP bindet ein von einer A-Domäne synthetisiertes Aminoacyladenylat als Thioester an das 3'-Cysteaminende eines Ppant-Kofaktors, der seinerseits als Ester an die Seitenkette eines invarianten Serins im CoreT des PCP's gebunden ist. Hierbei wird AMP freigesetzt. PCPs wechselwirken auch mit allen anderen Domänen.

Auch Biotinyl- und Lipoylabhängige Enzyme weisen solche kurzen, etwa 80 Aminosäuren große *carrier*-Domänen auf, die allerdings nicht homolog zu den PCPs sind [69, 70].

Die essentielle Modifikation des invarianten Serins im CoreT mit dem Kofaktor 4'-Phosphopantethein (Ppant) wird von einer speziellen Klasse von Enzymen katalysiert, den 4'-Phosphopantetheintransferasen (Ppant-Transferasen) [71-73]. Die Kristallstruktur einer solchen mit dem Surfactin Biosyntheseoperon assoziierten Ppant-Transferase (Sfp) [18], zeigt eine pseudo-dimere Struktur [74]. Die Ppant-Transferasen katalysieren den nukleophilen Angriff des Serin-Hydroxyl-O-Atoms auf die  $\beta$ -3'-Phosphatgruppe von CoASH. Als Substrate dienen demnach apo-PCPs und CoASH. Bei der Reaktion wird 3',5'-ADP freigesetzt (siehe Abbildung 2-7). Die Gene der Ppant-Transferasen des Sekundärmetabolismus sind oftmals mit NRPS Biosyntheseoperons assoziiert [18]. Interessanterweise werden PCPs nicht von Ppant-Transferasen des primären Metabolismus, wie z.B. von ACPS, welches die posttranslationale Modifikation der apo-ACPs von

Fettsäuresynthasen mit Ppant katalysiert, modifiziert. Sfp hingegen kann sowohl PCPs als auch ACPs modifizieren [75-77].



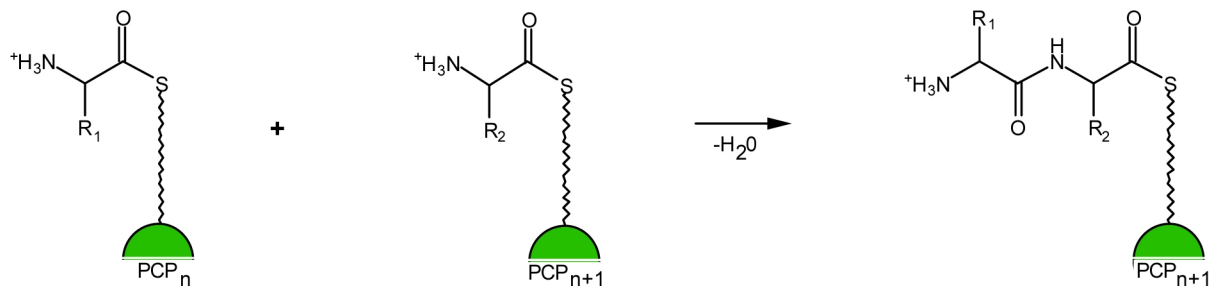
**Abbildung 2-7: Die enzymatische Funktion der 4'-Ppant-Transferasen**

Coenzym A bindende 4'-Phosphopantetheintransferasen (Ppant-Transferasen) katalysieren den Transfer von Ppant auf den invarianten Serinrest von PCPs oder ACPs.

### 2.3.3 Die Kondensationsdomäne

Neben den A-Domänen und den PCPs stellen die Kondensations-(C)-Domänen den dritten für eine Elongationsreaktion essentiellen Domärentyp dar. Die ca. 450 Aminosäuren großen C-Domänen katalysieren den nukleophilen Angriff der freien Aminogruppe des aminoacyl-S-Ppant-Akzeptors auf das elektrophile Carboxy-C-Atom des aminoacyl- oder peptidyl-S-Ppant Donors (siehe Abbildung 2-8) [52]. Die Peptidkette befindet sich nach der Elongationsreaktion als Thioester gebunden auf dem „downstream“ PCP und wird auf diese Weise unter Verlängerung um je einen Baustein von einem PCP zum nächsten weitergereicht (vergleiche Abbildung 2-3), bis das fertige Endprodukt schließlich auf einem Modul mit einer C-terminalen Terminationsdomäne angelangt ist, wo es abgespalten wird. Obwohl C-Domänen keine größeren Sequenzhomologien zu anderen bekannten Enzymen zeigen, so findet sich das hochkonservierte Sequenzmotiv CoreC3 ([HHxxxDGxS]; vergleiche Anhang C) auch in den Chloramphenicol-Acetyltransferasen [78], den Dihydrolipoyl-Transacetylasen [79], sowie interessanterweise in E-Domänen von NRPS (vergleiche auch Abbildung 2-14) [80]. Die beiden erstgenannten sind Enzymklassen, die wie die C-Domäne den Transfer von Thioester-aktivierten Acylgruppen katalysieren. Obwohl der genaue Katalyse-Mechanismus der C-Domänen noch nicht geklärt ist, so widerlegen neuere Mutationsexperimente aber die

diskutierte Existenz einer katalytischen Triade ähnlich den Serinproteasen (His-Asp-Ser) [80] und lassen einen Mechanismus wahrscheinlich erscheinen, der diesen beiden Enzymklassen



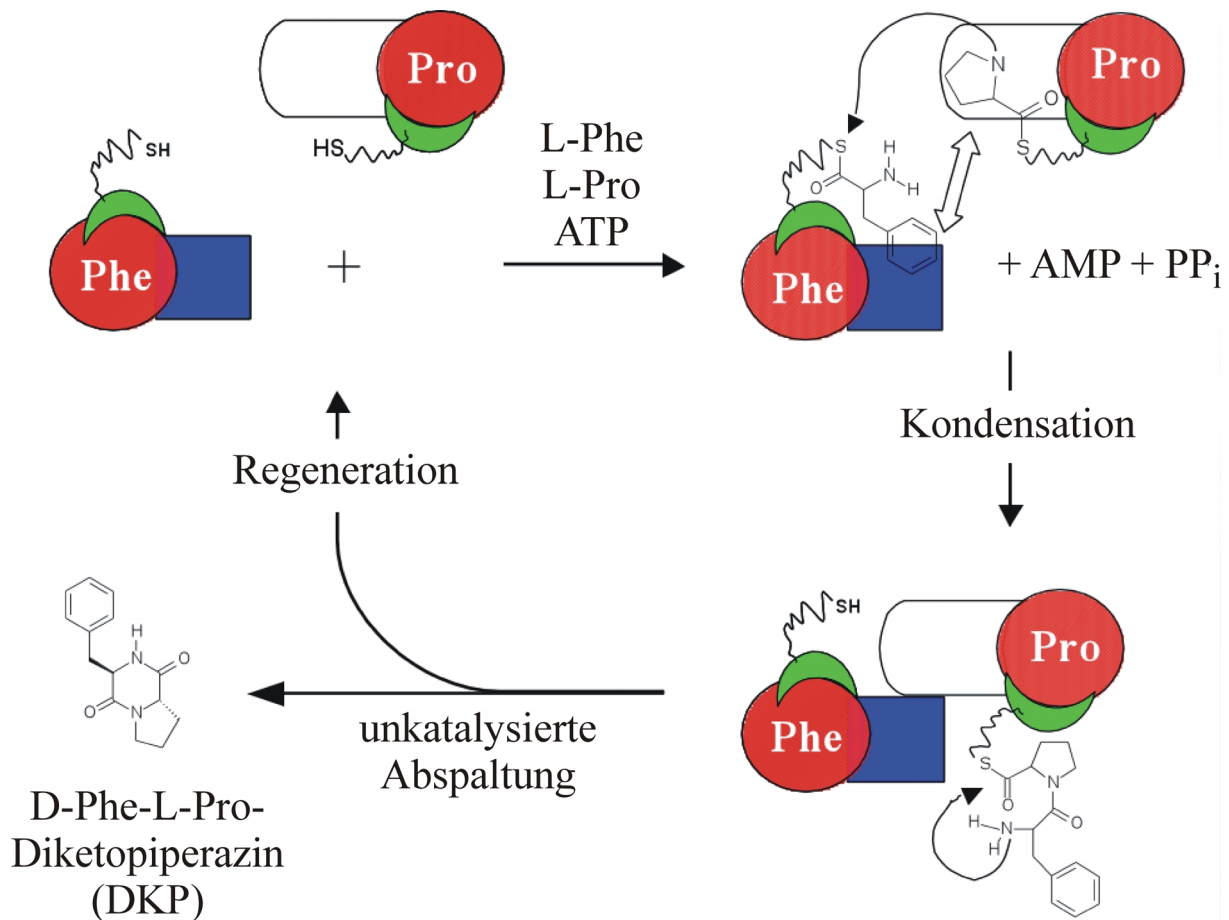
**Abbildung 2-8: Die katalytische Funktion der C-Domäne**

Die C-Domäne katalysiert die Peptidbindungsbildung (Kondensation) zweier als Thioester auf benachbarten PCPs gebundener Intermediate. Die Peptidkette befindet sich nach der Elongation auf dem downstream PCP ( $PCP_{n+1}$ ).

ähnelt [81]. Dabei kommt dem zweiten Histidin des CoreC3 eine essentielle Rolle bei der Katalyse zu. Wahrscheinlich erhöht es den nukleophilen Charakter der freien Aminogruppe des Akzeptor-S-Ppant Substrates. Die Funktion der C-Domäne konnte seinerzeit *in vitro* mit einem Modellsystem eindeutig belegt werden [52], welches aufgrund seiner Bedeutung für diese Arbeit hier kurz vorgestellt werden soll. Die Initiationssynthetase der Gramacidin S Biosynthese GrsA (A-PCP-E) aktiviert, bindet und epimerisiert Phenylalanin. Das erste Modul der Tyrocidin Synthetase TycB (C-A-PCP) aktiviert und bindet Prolin. Durch die oben beschriebene Kondensationsreaktion wird dann D-Phe auf TycB<sub>1</sub>-CAT übertragen, wodurch D-Phe-L-Pro-S-Ppant entsteht. Die freie Aminogruppe des D-Phe greift die Carbonylgruppe des Thioesters daraufhin intramolekular nukleophil an, wodurch zyklisches D-Phe-L-Pro-Diketopiperazin (DKP) unkatalysiert abgespalten wird und die Enzyme für einen weiteren Katalysezyklus zur Verfügung gestellt werden. Der gesamte Zyklus ist schematisch in Abbildung 2-9 dargestellt.

Lange Zeit war unklar, ob C-Domänen eine Substratspezifität besitzen. Durch Versuche mit biochemisch fehl-aminoacyliertem GrsA konnte in obigem Modellsystem gezeigt werden, dass die C-Domäne von TycB<sub>1</sub>-CAT eine Enantioselektivität für das elektrophile Donor-aminoacyl-S-Ppant Substrat besitzt, während die Bindestelle für das nukleophile Akzeptor-aminoacyl-S-Ppant Substrat eine hohe Substratspezifität aufweist. Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, verhindert die Substratspezifität der Akzeptorbindestelle eine interne

Mis-Initiation und steuert den Zeitpunkt der Epimerisierung im Falle einer peptidyl-E-Domäne [56].



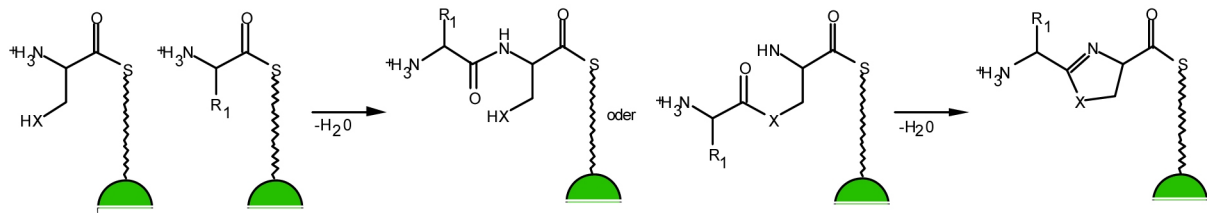
**Abbildung 2-9: DKP-Bildung durch die Enzyme GrsA/TycA und TycB1-CAT**

GrsA/TycA erkennt, aktiviert und epimerisiert L-Phe, TycB<sub>1</sub>-CAT erkennt und aktiviert L-Pro. Nach erfolgter Kondensationsreaktion greift die Aminogruppe des Phenylalanins die Carbonylgruppe des Thioesters nukleophil an, so dass unter Zyklisierung D-Phe-L-Pro-Diketopiperazin (DKP) in einer nicht-katalysierten Reaktion vom Enzymtemplat abgespalten wird und die Enzyme für einen neuen Katalysezyklus regeneriert werden.

### 2.3.4 Die Heterozyklisierungsdomäne

In einigen Fällen kann die C-Domäne durch eine Heterozyklisierungs-(Cy)-domäne substituiert sein. Cy-Domänen unterscheiden sich in ihrer Primärstruktur deutlich von C-Domänen, so ist das Coremotiv C3 ([HHxxxDGxS]; vergleiche Anhang C), welches das für die katalytische Aktivität von C-Domänen essentielle Histidin enthält, durch C3' ([ (DNR)xxxxDxxS]; vergleiche Anhang C) substituiert. Ist das Akzeptorsubstrat ein Cystein,

Serin oder Threonin, so wird bei Vorhandensein einer Cy-Domäne ein Thiazolin bzw. ein Oxazolin gebildet [16, 27, 42, 82]. Die Reaktion ist schematisch in Abbildung 2-10 dargestellt, wobei der Mechanismus noch ungeklärt ist. Insbesondere ist nicht bekannt, ob eine Peptidbindungsbildung (wie bei den C-Domänen) oder aber eine (Thio-)Esterbildung der Heterozyklisierung vorausgeht [83].



**Abbildung 2-10: Die katalytische Funktion der Cy-Domäne**

Die Cy-Domäne katalysiert die Bildung von Ringstrukturen des Oxazolin- oder Thiazolintyps mit den Aminosäuren Serin, Threonin oder Cystein. Der Mechanismus ist, ebenso wie bei der C-Domäne, noch ungeklärt. Insbesondere ist noch nicht geklärt, ob analog zur C-Domäne zunächst die Peptidbindung geknüpft wird oder aber ob die Bildung eines (Thio-)Esters der Bildung der Peptidbindung vorausgeht.

Bei ribosomal synthetisierten Peptiden ist eine solche Heterozyklenbildung während der Synthese nicht möglich. Dennoch sind auch einige Peptide ribosomalen Ursprungs bekannt, wie z.B. das Microcin aus *E. coli*, die heterozyklische Strukturen besitzen. Diese werden posttranslational mittels ATP-abhängiger Enzyme erzeugt [84]. Der Vergleich der Primärstrukturen dieser Enzyme mit denen der Cy-Domänen zeigt aber keine Homologien.

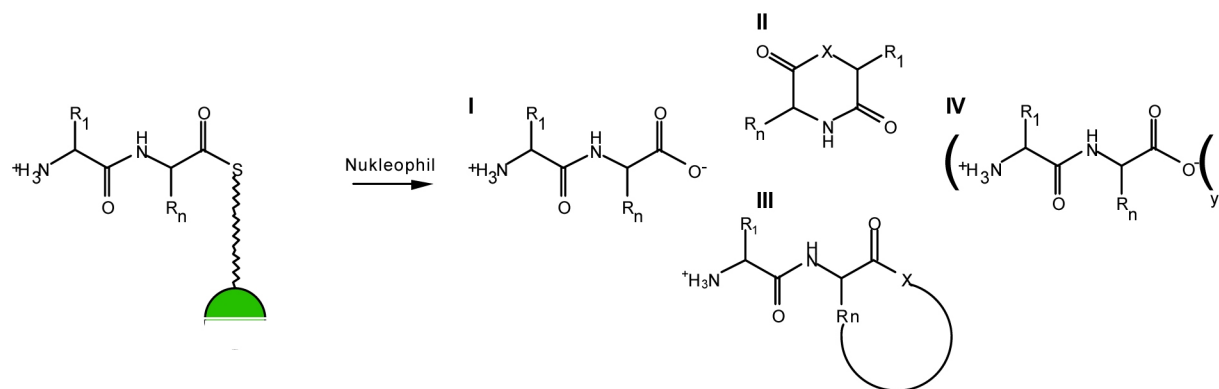
### 2.3.5 Terminationsdomänen

Es sind verschiedene Terminationsdomänen bekannt. In bakteriellen Operons findet man meist Thioesterasedomänen (Te-Domänen) die mit dem C-Terminus des letzten Moduls von NRPS verbunden sind [85]. Ihre Länge beträgt ca. 250 Aminosäuren und sie katalysieren die Abspaltung des Endproduktes vom NRPS Templat (siehe Abbildung 2-11). Dies kann unter Hydrolyse (lineare Produkte) oder intramolekularer Zyklisierung (Lacton- bzw. Lactambildung) geschehen. Es ist auch eine Multimerisierung auf Te-Domänen bekannt [86, 87]. Inzwischen konnte wiederholt gezeigt werden, dass die künstliche Fusion von Te-Domänen an Module zur Abspaltung verkürzter Produkte führt [88-91]. Ebenso wurde beobachtet, dass die Te-Domäne des Tyrocidin-Operons [15] *in vitro* die Zyklisierung von sogenannten SNAC-Peptidderivaten, die das 3'-Endes eines aminoacylierten Ppant-Kofaktors

imitieren und frei diffundierbar sind, katalysiert und dabei eine breite Substrattoleranz besitzt [92-94]. Kürzlich konnte die Struktur der Surfactin Te-Domäne aufgeklärt werden [95]. Das katalytische Zentrum bildet eine katalytische Triade ähnlich der der Serinproteasen.

Neben den beschriebenen Te-Domänen findet man auch separate Thioesterasedomänen (Te<sub>II</sub>S; Größe ca. 220 Aminosäuren), die für die nichtribosomale Peptidsynthese zwar nicht essentiell sind, deren Deletion aber *in vivo* zu drastisch verringerten Produktausbeuten führte [85]. Eine mögliche Rolle als „Cleaning-Enzyme“ wird diskutiert [96].

Eine weitere Alternative der Produktfreisetzung wird von den Reduktase-(Red)-domänen katalysiert. Unter NADPH Verbrauch werden Peptide mit C-terminaler Aldehyd- oder Alkoholgruppe freigesetzt [97]. So resultiert die reduktive Abspaltung eines Peptides mit Alanin am C-terminalen Ende in einem Produkt, dessen C-Terminus ein Ethanolamin bildet [54]. Red-Domänen finden sich auch in Enzymen der Lysin-Biosynthese in Hefen [98].



**Abbildung 2-11: Die katalytische Funktion der Te-Domäne**

Die Te-Domäne katalysiert die Abspaltung der enzymgebundenen Peptide. Dabei können lineare (I), zyklische (II) oder verzweigt zyklische (III) Produkte entstehen. Auch eine Multimerisierung auf einer Te-Domäne (IV) wurde nachgewiesen [86]. X = N, O

In fungalen NRPS Operons fehlen diese Typen von Terminationsdomänen [21, 29]. Hingegen findet man am C-Terminus pilzlicher NRPS meist eine zusätzliche C-Domäne, die offenbar die Aminogruppe der Starteraminosäure als Nukleophil verwendet [99].

### 2.3.6 Optionale Modifikationsdomänen

Durch modifizierende Domänen wird die strukturelle Vielfalt, die den großen Unterschied zu ribosomal synthetisierten Peptiden ausmacht, und damit verbunden auch die Bioaktivität der nichtribosomal synthetisierten Peptide ganz erheblich erweitert. Neben der Epimerisierung, N-Methylierung oder N-Formylierung von Aminosäuren sind die Heterozyklenbildung, die

Oxidation solcher Heterozyklen und die Ausbildung von Amid- und Esterbindungen bekannt. Aufgrund ihrer Bedeutung für diese Arbeit werden insbesondere die Epimerisierungsdomänen eingehend behandelt, wobei mechanistische Aspekte, sowie ihre Klassifizierung, weiter unten erläutert werden.

### 2.3.6.1 Die Epimerisierungsdomäne

Die für die  $C_{\alpha}$ -Epimerisierung der Substrataminosäuren verantwortlichen Epimerisierungsdomänen besitzen eine ungefähre Größe von 450 Aminosäuren. Sie sind innerhalb eines Moduls stets C-terminal des zugehörigen PCP's zu finden [1]. Bezüglich ihrer Lokalisation lassen sie sich in C-terminale sowie in interne E-Domänen unterteilen. Erstere bilden den C-Terminus einer Synthetase, was man sehr häufig in bakteriellen Operons beobachten kann, letztere sind sowohl N- als auch C-terminal kovalent mit weiteren Domänen verknüpft. Es gibt Hinweise, dass C-terminale E-Domänen maßgeblich an der spezifischen gegenseitigen Erkennung zweier Synthetasen beteiligt sind [52, 57]. Hinsichtlich ihrer Funktion lassen sich ebenfalls zwei Typen von E-Domänen unterscheiden. Man findet aminoacyl-E-Domänen, welche in Initiationsmodulen zu finden sind und die Epimerisierung eines aminoacyl-S-Ppant Substrates katalysieren [100], sowie peptidyl-E-Domänen, welche in Elongationsmodulen lokalisiert sind. Letztere katalysieren die  $C_{\alpha}$ -Epimerisierung offenbar erst auf peptidyl-S-Ppant Ebene, nachdem die Peptidbindungsbildung mit dem „upstream“ Substrat stattgefunden hat [101, 102]. Zum Beginn dieser Arbeit war unklar, ob es mechanistische Unterschiede zwischen aminoacyl- und peptidyl-E-Domänen gibt und worauf die unterschiedlichen Zeitpunkte der Epimerisierungsreaktion zurückzuführen sind.

Es konnte gezeigt werden, dass die Epimerisierungsreaktion eine Gleichgewichtsreaktion zwischen der D- und der L-Aminosäure ist. Die Reaktion findet sowohl von L-nach-D als auch von D-nach-L statt [57]. Kürzlich wurde durch "Rapid-Quench"-Kinetik-Untersuchungen gefunden, dass dieses Gleichgewicht sehr schnell (im Falle von GrsA in weniger als zwei Sekunden) erreicht wird [103]. In den Endprodukten findet man aber aufgrund der Enantioselektivität der nachfolgenden Kondensationsdomänen nur die D-konfigurierten Substrate.

Über die Spezifität von E-Domänen war zu Beginn dieser Arbeit noch nichts bekannt. Fehlaminacylierungsuntersuchungen von GrsA mit aminoacyl-CoA-Derivaten lieferten dann erste Hinweise, dass E-Domänen eine gewisse Substrattoleranz besitzen könnten. So epimerisierte die E-Domäne von GrsA, deren natürliches Substrat L-Phe-S-Ppant ist, auch L-



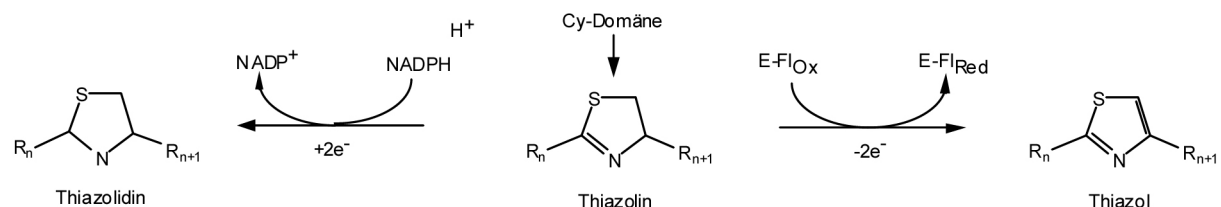
Ala-S-Ppant [104]. Weitere Untersuchungen zur Substratspezifität von E-Domänen sind in dieser Arbeit beschrieben und sollen hier nicht vorweggenommen werden.

### 2.3.6.2 Die N-Methylierungsdomäne

Die N-Methylierung spielt vor allem in fungalen NRPS eine Rolle. Bisher sind nur wenige Beispiele bakterieller M-Domänen bekannt (z.B. Pristinamycin I) [105]. Die Besonderheit bei der Lokalisation der ca. 420 Aminosäuren großen M-Domänen [106, 107] besteht in ihrem Einschub in die A-Domäne zwischen die Coremotive A8 und A9, was dem flexiblen Bereich zwischen der großen und der kleinen Untereinheit entspricht. Es gibt Hinweise, dass die N-Methylierung auf Aminoacylstufe stattfindet [108, 109] und der Kofaktor S-Adenosylmethionin (SAM) als Methyl donor fungiert.

### 2.3.6.3 Weitere Modifikationsdomänen- Oxidations- und N-Formylierungsdomänen

In letzter Zeit wurden unter anderem in den Biosyntheseclustern von Epothilon [27, 110] und Myxothiazol [111] Oxidations-(Ox)-domänen entdeckt, die in Kombination mit Cy-domänen die Oxidation der gebildeten Thiazolinstrukturen zu den entsprechenden Thiazolen (vergleiche Abbildung 2-12) zu katalysieren scheinen und wahrscheinlich Flavin-abhängig sind. Es sind zwei Typen von



**Abbildung 2-12: Bildung von Thiazol- und Thiazolidin-Strukturen**

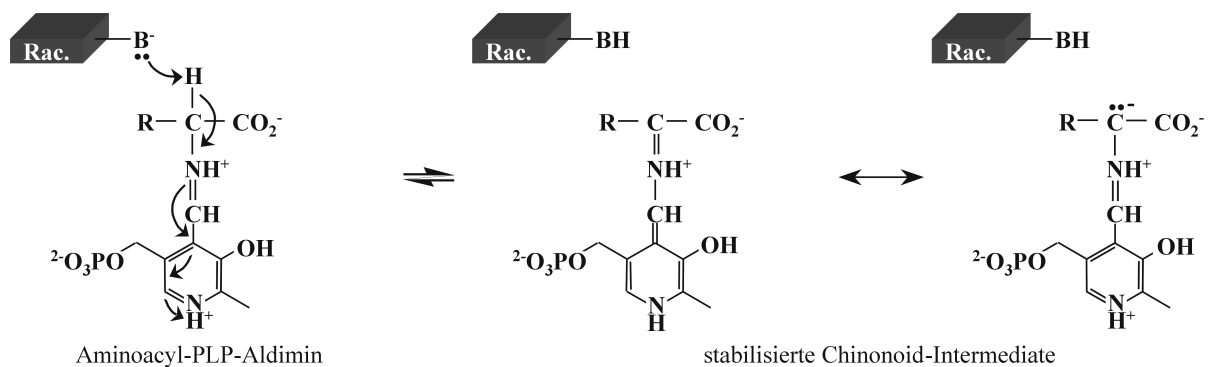
Die Heterozyklisierungsreaktion, die durch die Cy-Domäne katalysiert wird, führt zur Bildung von Heterozyklen des Thiazolintyps. Die Oxidation scheint von einer Flavin-abhängigen Oxidase, die als optionale Domäne innerhalb von A-Domänen zu finden ist, vollzogen zu werden. Die Reduktion zum Thiazolidin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

Ox-Domänen bekannt. Sie können, wie die N-Methylierungsdomänen auch, in die A-Domäne inseriert sein (zwischen CoreA8 und CoreA9) oder aber sich C-terminal des PCP's befinden. Die optionale Reduktion von Thiazolinen zu Thiazolidinen erfolgt dagegen durch externe NADPH-abhängige Enzyme [112].

Kürzlich wurde eine N-Formyltransferasedomäne beschrieben, die eine N-Formylierung der Substrataminosäure durchführt [113]. Als Kofaktor wird N<sub>5</sub>-formyl-Tetrahydrofolat vermutet. Dieser Domärentyp scheint selten zu sein und wird auch im Biosynthesecluster für lineares Gramicidin A vermutet [114], der aber bisher noch nicht charakterisiert wurde.

## 2.4 Die Biosynthese von D-Aminosäuren

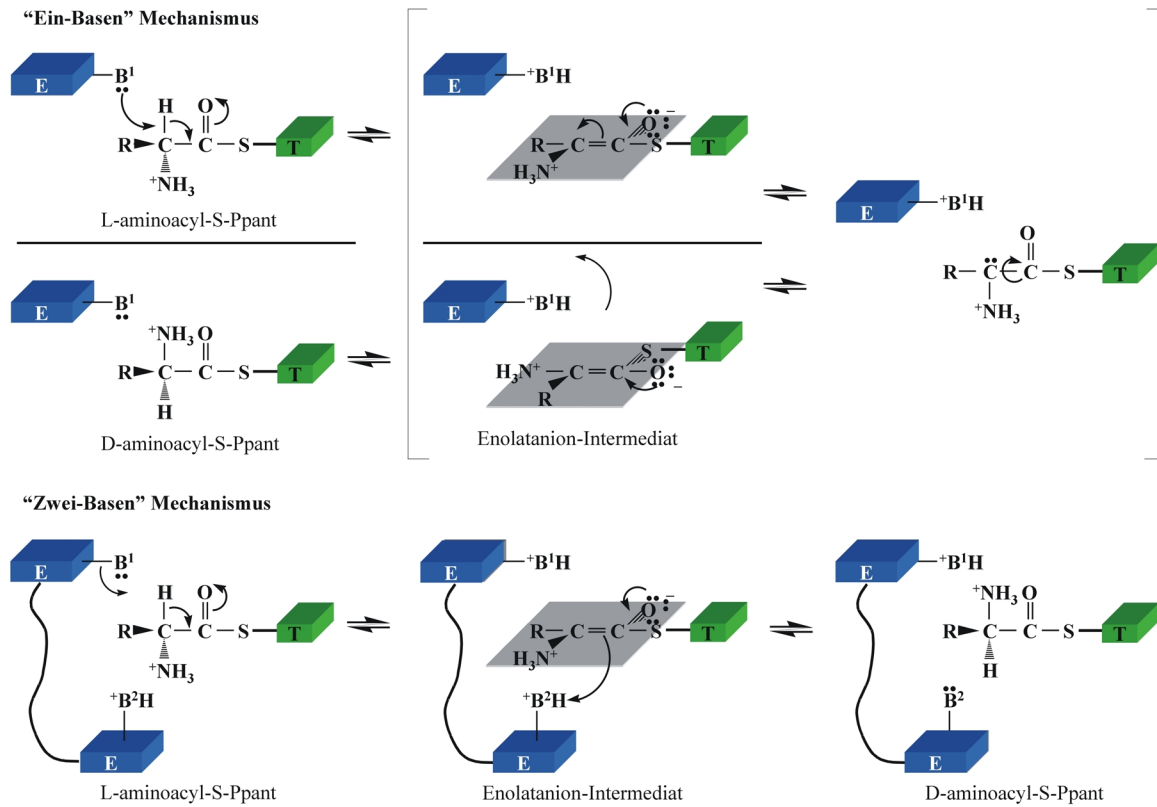
Die Konfigurationsumkehr von Aminosäuren wird generell durch Racemasen oder Epimerasen katalysiert. Alle bekannten Aminosäureracemasen katalysieren die Konfigurationsumkehr dabei durch De- und anschließende Reprotonierung des C<sub>α</sub> [115, 116]. Chemisch betrachtet ist es sehr schwierig das Proton am C<sub>α</sub> einer Aminosäure zu abstrahieren, da es nicht azid ist (pK<sub>a</sub>s bis zu 21) [117]. Eine Klasse von Racemasen, zu denen auch die Alanin-Racemasen gehören, die D-Alanin zur Zellwandbiosynthese von Bakterien bereitstellen, nutzt deshalb Pyridoxalphosphat (PLP) als Kofaktor [118, 119]. Dabei wird die Aminogruppe der Aminosäure als Schiff'sche Base an PLP gebunden (aminoacyl-PLP-Aldimin), wodurch das entstehende Carbanion-Intermediat resonanzstabilisiert wird (vergleiche Abbildung 2-13). Es gibt aber auch PLP-unabhängige Racemasen, so zum Beispiel die Prolin- [120], die Diaminopimelat- [121, 122] die Aspartat- [122] und die Glutamat-Racemasen [123, 124]. Bei letzteren hat man zwei Cysteine identifiziert, die essentiell für die Aktivität sind. Ein Cystein liegt offenbar als Thiolat vor und deprotoniert das C<sub>α</sub> der Aminosäure, während das Proton der SH-Gruppe des zweiten Cysteins anschließend zur Reprotonierung dient.



**Abbildung 2-13: Mechanismus einer PLP-abhängigen Racemase**

Die zu epimerisierende Aminosäure bildet mit Pyridoxalphosphat (PLP) ein Aldimin. Bei der Abstraktion des C<sub>α</sub>-Protons der Aminosäure wird das gebildete Carbanion resonanzstabilisiert, so dass die Abstraktion wesentlich erleichtert wird.

A) Diskutierte alternative E-Domänen Mechanismen



B) Proton-Abstraktion durch NRPS C und E Domänen

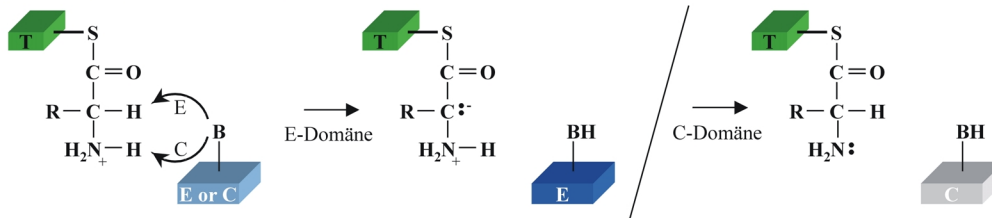


Abbildung 2-14: Diskutierte alternative E-Domänen Mechanismen und der mechanistische Vergleich zu C-Domänen

(A) Für E-Domänen werden zwei alternative Mechanismen diskutiert. Beim „Ein-Basen“-Mechanismus wird die De- und die anschließende Reprotonierung durch dieselbe Base ausgeführt. Eine Konfigurationsumkehr am  $C_\alpha$  ist hierbei nur möglich, wenn auf der Stufe des Carbanions eine Rotation um die C-C-Bindungsachse erfolgt. Das stabilisierte Enolatanion-Intermediat hingegen ist planar und kann nicht rotieren. Beim „Zwei-Basen“-Mechanismus deprotoniert Base<sup>1</sup> das  $C_\alpha$ , während die Reprotonierung im planaren Übergangszustand durch die konjugierte Säure einer anderen Base (Base<sup>2</sup>) von der gegenüberliegenden Seite erfolgt. (B) E-Domänen und C-Domänen besitzen beide das sogenannte „His-Motiv“ [HHxxxDGxS] (CoreE2 bzw. C3; vergleiche Anhang C). Es wird vermutet, dass das zweite Histidin dieses Motivs sowohl in die Deprotonierung des  $C_\alpha$  (E-Domänen), als auch in die der Aminogruppe (C-Domäne) involviert ist.

Da keine Sequenzhomologien zu anderen Epimerasen/Racemasen bestehen, handelt es sich bei den E-Domänen aus NRPS-Systemen um eine eigenständige Klasse von Aminosäureepimerasen [1]. Es konnte kein Kofaktor wie bei den PLP-abhängigen Aminosäureracemasen nachgewiesen werden [125, 126]. Als Substrate der E-Domänen dienen nicht die freien Aminosäuren, sondern enzymgebundene aminoacyl- oder peptidyl-S-pant Substrate. Trotz kürzlich durchgeführter Mutationsanalyse der Epimerisierungsdomäne von GrsA (der Initiationssynthetase der Gramacidin S Biosynthese), wo alle hochkonservierten Reste mit potentieller katalytischer Funktion mutiert wurden, konnte der Mechanismus nicht eindeutig geklärt werden [57]. Nach wie vor werden der Zwei-Basen- und der Ein-Basen-Mechanismus (siehe Abbildung 2-14-A) diskutiert. Sicher scheint aber, dass der zweite Histidinrest im Sequenzmotiv CoreE2 ([HHxxxDGxS]; vergleiche Anhang C) eine essentielle katalytische Funktion bei der Deprotonierung des C $\alpha$  besitzt (Anhang C) [80]. Es ist denkbar, dass er in E- und C-Domänen, die beide dieses Coremotiv besitzen, eine ähnliche katalytische Funktion ausübt. Bei der Epimerisierung muss das C $\alpha$  deprotoniert werden, bei der Peptidbindungsbildung die Aminogruppe um ihre Nukleophilie zu erhöhen (vergleiche Abbildung 2-14-B). Die endgültige Klärung des Mechanismus der E-Domänen kann wohl nur mit Hilfe bisher noch nicht verfügbarer Strukturdaten erfolgen.

## **2.5 Die Inkorporation von D-Aminosäuren in nichtribosomal synthetisierte Peptide**

D-konfigurierte Aminosäuren spielen für die Bioaktivität der nichtribosomal synthetisierten Polypeptidstrukturen eine entscheidende Rolle [1]. Wahrscheinlich verlangsamen sie den proteolytischen Abbau, da die meisten Proteasen nur Peptidbindungen zwischen L-Aminosäuren effizient spalten können. Aber auch spezifische durch die Stereochemie hervorgerufene Effekte sind möglich.

In NRPS Systemen sind zwei Wege für die Inkorporation dieser seltenen Bausteine realisiert. Zum einen können die L-Aminosäuren durch in das entsprechende Modul integrierte E-Domänen epimerisiert werden [127]. Die von den E-Domänen katalysierte Epimerisierung ist eine Gleichgewichtsreaktion [57]. Dass trotzdem nur die D-konfigurierte Aminosäure in das Produkt eingebaut wird, wird von einer postulierten enantioselektiven Donorbindungsstelle in der nachfolgenden C-Domäne sichergestellt [104]. Zum anderen können die D-Aminosäuren selektiv durch enantioselektive A-Domänen aktiviert werden [25]. Hierbei werden die D-konfigurierten Aminosäuren dann durch externe Racemasen bereitgestellt [128, 129].

Auffällig ist, dass die Epimerisierung über E-Domänen anscheinend in bakteriellen Systemen bevorzugt wird [16, 130-132], während die zweite Variante bevorzugt in pilzlichen NRPS Systemen realisiert zu sein scheint [25]. Es gibt jedoch auch Ausnahmen. So finden sich zum Beispiel in dem bakteriellen System zur Syringomycin Synthese (*Pseudomonas syringae*) [55] A-Domänen, die selektiv D-Aminosäuren aktivieren, während in dem pilzlichen Biosyntheseoperon für Penicillin (ACV-Synthetase; *Penicillium chrysogenum*) [133] eine Epimerisierungsdomäne kodiert ist. Im fungalen Biosyntheseoperon für HC-Toxin (*Chochliobolus carbonum*) sind sogar beide Varianten verwirklicht [21, 129].

## 2.6 Aufgabenstellung

Im Vordergrund der Aufgabenstellung standen Untersuchungen zur Spezifität von E-Domänen aus NRPS-Systemen. Zum einen sollte der Frage nach der Substratspezifität von E-Domänen nachgegangen werden. Das heißt, es sollte untersucht werden, wie effizient E-Domänen nicht-kognate Substrate epimerisieren können. Hierzu sollten unter anderem Fusionsproteine hergestellt werden, in denen E-Domänen auf genetischer Ebene an andere Module bzw. A-Domänen unterschiedlicher Spezifität fusioniert sind. Damit sollten neben der Frage der E-Domänen-Selektivität zunächst die Fragen nach der Verwendbarkeit dieser Methode für E-Domänenfusionen sowie nach der geeignetsten Fusionsstelle beantwortet werden.

Zum anderen sollte untersucht werden, ob aminoacyl- und peptidyl-E-Domänen unterschiedliche Substratspezifitäten aufweisen oder ob der beobachtete funktionale Unterschied alleine durch ihre Einbettung in eine andere Proteinumgebung (aminoacyl-E-Domänen sind stets in Initiations-, peptidyl-E-Domänen in Elongationsmodulen lokalisiert) beeinflusst wird. In diesem Zusammenhang sollte auch geklärt werden, wodurch sich ein Initiationsmodul von einem Elongationsmodul unterscheidet und welche Mechanismen eine interne Mis-Initiation verhindern. Hierzu musste zunächst ein geeignetes *in vitro* Modellsystem entwickelt werden.

### 3 Material

#### 3.1 Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterial

**Tabelle 3-1 Liste der benutzten Chemikalien, Enzyme und Kits:** Bei nicht gesondert aufgeführten Chemikalien wurden stets Standardprodukte namhafter Hersteller (insbesondere Merck sowie Sigma/Aldrich) in p.a.-Qualität verwendet

Hersteller (Vertriebsort)	Produkt
Applied Biosystems(Weiterstadt)	ABI Prism dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit V 2.0
Amersham/Buchler (Braunschweig)	$\lambda$ -DNA, Restriktionsendonucleasen, DNA-modifizierende Enzyme, Ampicillin, IPTG, Kanamycin, Hefeextrakt, Coomassie Brilliant Blue G und R250, Agar Nr.1
Biomol (Ilvesheim)	DTT und DTE
Biotrend (Köln)	[ <sup>14</sup> C]-D-Phenylalanin, Peptidstandards L-Phe-L-Asn (FN), L-Phe-D-Phe-L-Asn (FfN) und L-Phe-L-Phe-L-Asn (FFN) für HPLC
Boehringer Mannheim (Mannheim)	Expand Long Template PCR System
Difco (Detroit, USA)	Hefeextrakt
DuPont/NEN (Bad Homburg)	<sup>32</sup> P-Pyrophosphat (16 Ci/mmol)
Eurogentech (Seraing, Belgien)	Agarose, Elektrotransformations-Küvetten
Fluka (Neu Ulm)	TEMED, SDS
Gibco BRL (Eggenstein)	10 kDa Proteinmolmarker
Hartmann-Analytik (Braunschweig)	[ <sup>14</sup> C]- und [ <sup>3</sup> H]-markierte Aminosäuren
Kodak (Rochester, USA)	Röntgenfilme Biomaxx MR
Merck (Darmstadt)	HPTLC-Fertigplatten CHIR (chiral, 10x10 cm) und Silica gel 60 DC-Alufolien (20x20 cm), versch. Feinchemikalien
MWG Biotech (Ebersberg)	synthetische Oligonukleotide
Oxoid (Wesel)	Agar Nr.1, Trypton
Qiagen (Hilden)	QIAquick-spin, PCR Purification Kit, Ni-NTA-

Roth (Karlsruhe)	Agarose, QIAexpress Vektor Kit ATG Ethidiumbromid, $\beta$ -Mercaptoethanol, Acrylamid- Lösung für SDS-PAGE, Szintillationsflüssigkeit Rotiszint Eco Plus
Schleicher & Schüll (Dassel)	Sterilfilter (Porengröße 0,45 $\mu$ m und 0,2 $\mu$ m), Whatman 3MM Papier
Serva (Heidelberg)	Bromphenolblau, Xylencyanol, Visking- Dialyseschläuche
Sigma (Deisenhofen)	Desoxinukleotide (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) versch Standardchemikalien
Stratagene (Heidelberg)	QuickChange Site Directed Mutagenesis Kit

### 3.2 Geräte

**Tabelle 3-2 Geräte, Hersteller und Typenbezeichnung:** Bei nichtaufgeführten Geräten handelt es sich stets um Standardmodelle üblicher Laborgerätehersteller

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller mit Typenbezeichnung</b>
DNA-Sequenzier	<i>PE Applied Biosystems</i> ABI Prism 310 Genetic Analyzer
Elektroporations-Pulser	<i>Bio-Rad</i> Gene Pulser und Pulse-Controller
FPLC-System	<i>Amersham/Pharmacia</i> Äkta „Prime“
French Press	<i>Sim Aminco</i> French-Presssure Cell-Version 5.1 20k Rapid-fill cell (40 mL)
Heizschüttler	<i>Eppendorf</i>
HPLC-MS-System	<i>Agilent/Hewlett Packard</i> Series 1100 MSD HPLC-System mit DAD-Detektor, Vakuumentgaser, quaternärer Pumpe, Autosampler und HP-Chemstation Software
HPLC-Trennsäulen	<i>Macherey &amp; Nagel</i> „Nucleosil C18“ <i>Merck</i> „Chiradex Gamma“
Luftschüttler	<i>New Brunswick Scientific</i> Series 25 Incubator Shaker
Mikrotiterplattenlesegerät	<i>Dynatech</i> MR 7000
Photometer	<i>Pharmacia Biotech</i> Ultraspec 3000
Radioaktivitätsscanner	<i>Raytest</i> RITA
Reinstwasseranlage	<i>Seral</i> Seralpur Pro90CN
Speed-Vac	<i>Savant</i> Speed Vac Concentrator <i>Uniequip</i> Univapo 150 H
Szintillationszähler	<i>Packard</i> 1900CA Tri-CARB Liquid Szintillation Analyzer
Thermo-Cycler	<i>PE Applied Biosystems</i> Gene Amp PCR System 2400 <i>Perkin Elmer</i> Gene Amp PCR System 9600
Zentrifugen	<i>Heraeus</i> Mikrofuge pico, Minifuge RF <i>Sorvall</i> RC26 plus <i>Sorvall</i> RC 5b



### 3.3 Vektoren

#### 3.3.1 pQE60 und pQE70

Die beiden zum Expressionssystem „QIAexpressionist“ (Qiagen) gehörenden Vektoren pQE60 und pQE70 (jeweils 3431 bp) unterscheiden sich lediglich in ihrer MCS. Sie gehören zu der Familie der pDS-Plasmide [134] und basieren auf dem Plasmid pDS56/RBSII. Sie wurden als Standardvektoren für das Klonieren und Expressieren aller verwendeter Peptidsynthetase-Module und ihrer Fragmente verwendet.

Sie besitzen den T5-Promotor  $P_{N25}$  [135], zwei Erkennungssequenzen für den *lac*-Repressor, sowie eine synthetische ribosomale Bindungsstelle, die auf hohe Expressionsraten in *E. coli* optimiert ist. Eine *in frame* Ligation in die MCS führt zu einer C-terminalen Fusion der rekombinanten Proteine mit sechs Histidinen (*His<sub>6</sub>-tag*). Die MCS des pQE60 enthält *NcoI*, *BamHI* und *BglIII*, die des pQE70 *SphI*, *BamHI* und *BglIII*. Die in den Erkennungssequenzen von *NcoI* und *SphI* enthaltenen ATGs dienen jeweils als Startcodon. Durch die Expression des  $\beta$ -Lactamasegens *bla* verleiht das Plasmid den Bakterien eine Resistenz gegenüber Ampicillin. Die Replikation in *E. coli* erfolgt über den ColE1 Replikationsursprung aus pBR322 [136]. Da die Expression der gewünschten Gene mit Hilfe der *lac*-Operatoren reprimierbar ist, wurde diese stets in Gegenwart des Plasmides pREP4 durchgeführt, welches den *lac*-Repressor kodiert. Die Expression wurde dann mit IPTG induziert, welches eine Konformationsänderung des *lac*-Repressors bewirkt, was zu einer Dissoziation des *lac*-Repressors vom *lac*-Operator führt.

#### 3.3.2 pREP4

Das Plasmid pREP4 (3740 bp) ist mit seinem Replikationsursprung P15A [137] kompatibel zu ColE1 Plasmiden und kann so in Kombination mit den pQE-Vektoren stabil repliziert werden. Es dient zur Expression des durch das *lacI*-Gen [138] kodierten *lac*-Repressors. Durch das *neo*-Gen vermittelt es eine Resistenz gegenüber Kanamycin. Aufgrund einer Mutation in der zugehörigen RBS sollten jedoch nur Kanamycin-Konzentrationen von 25  $\mu\text{g/mL}$  zur Selektion eingesetzt werden. Dieses Plasmid wurde stets bei der Expression von in pQE-Vektoren klonierten Genen verwendet um eine gezielte Induktion der Expression sicherzustellen.

## 3.4 Mikroorganismen

### 3.4.1 *E. coli* XL1-Blue

*E. coli* XL1-Blue ist ein Standard-Laborstamm der zur Klonierung von Genen routinemäßig eingesetzt wird. Der Genotyp sei hier kurz beschrieben [139]: *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*, *supE44*, *relA1*, *lac*, {F'*proAB*<sup>+</sup>, *lacI*<sup>q</sup>, *lacZ*ΔM15, Tn10(Tet<sup>r</sup>)}

### 3.4.2 *E. coli* M15

Dieser Stamm ist einer der für das Expressionssystem „QIAexpressionist“ (*Qiagen*) empfohlenen Expressionsstämme. Sein Genotyp sieht wie folgt aus: *nal*<sup>s</sup>, *str*<sup>s</sup>, *rif*<sup>r</sup>, *lac*, *ara*, *gal*, *mtl*, F<sup>[140]</sup>.

### 3.4.3 *E. coli* SG13009

Dieser Stamm wird ebenfalls für das Expressionssystem „QIAexpressionist“ (*Qiagen*) empfohlen und wurde alternativ zu *E. coli* M15 verwendet.

## 3.5 Medien

Zur Anzucht der *E. coli* Stämme diente LB-Medium.

<b>LB-Medium</b>	16	g/L	Bactotrypton
	10	g/L	Hefeextrakt
	5	g/L	NaCl

Zur Expression wurde ausschließlich 2xYT-Vollmedium [141] verwendet, welches zur Steigerung der Löslichkeit der NRPS-Proteine bei Expressionsansätzen 10 mM Mg<sup>2+</sup>-Ionen enthält. Zur Vorbeugung von Phageninfektionen wurde nach dem Autoklavieren Natriumcitrat (Endkonzentration 20mM) zugegeben.

<b>2xYT-„Expressionsmedium“</b>	16	g/L	Bactotrypton
	10	g/L	Hefeextrakt
	5	g/L	NaCl
	10	mM	MgCl <sub>2</sub>
	20	mM	Natriumcitrat

Zum Herstellen von Kulturplatten wurde dem Medium vor dem Autoklavieren 1,5% (w/v) Agar Nr.1 zugesetzt. Zur Sterilisation wurden alle Lösungen und Medien vor dem Gebrauch

20 min bei 121°C und 1,5 bar autoklaviert. Die hitzeempfindlichen Antibiotika wurden den Medien bei Bedarf als sterilfiltrierte Lösungen bei einer Temperatur von <60°C in folgenden Endkonzentrationen zugesetzt:

100	µg/mL	Ampicillin
25	µg/mL	Kanamycin

## 4 Methoden

In dem Methodenteil sind nur die Techniken beschrieben, die sich grundlegend von den in Standardwerken [142] beschriebenen Methoden der molekularen Genetik und Biochemie unterscheiden. Die Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde nach dem Verfahren der alkalischen Lyse nach Birnboim & Doly [143] durchgeführt. Die Reinigung von DNA erfolgte mittels Qiagen-Kits, denen das von Vogelstein entwickelte Prinzip der Anionenaustauscherchromatographie zugrunde liegt [144]. Bei der Verwendung von Kits wurden, sofern nicht gesondert angegeben, die Protokolle des Herstellers befolgt.

Techniken der Protein-Biochemie wurden durchgeführt wie beschrieben für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese in [145], für die anschließende Coomassie-Färbung in [146] und für die Bestimmung der Proteinkonzentration in [147].

### 4.1 Molekularbiologische Methoden – DNA Techniken

#### 4.1.1 PCR-Amplifikation von DNA-Fragmenten

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) [148, 149] wurde zur Amplifikation aller benötigten DNA-Fragmente benutzt. Dazu wurde der Expand<sup>TM</sup> Long Template PCR Kit (*Böhringer Mannheim*), der eine Taq- und eine Pwo-DNA-Polymerase enthält, nach dem Protokoll des Herstellers angewandt. Die Länge der Zyklen wurde an die Größe der jeweiligen Fragmente angepaßt, die Hybridisierungstemperaturen nach Art der verwendeten Primer variiert. In der Regel wurden die Primer so ausgewählt, dass die Annealing-Temperaturen im Bereich von 50°C-60°C lagen. An den Enden der zur Klonierung bestimmten Fragmente wurden durch die Wahl geeigneter Oligonukleotidsequenzen für die PCR die Erkennungsschnittsequenzen der gewünschten Restriktionsendonukleasen eingeführt. Ein typischer Reaktionsansatz sah wie folgt aus:

PCR-Ansatz	DNA-Templat	0,05-0,5 ng
	Oligonukleotide jeweils	50 pmol
	dNTP's (Stammlösung je 2mM)	2,5 µL
	10x PCR-Puffer III	2,5 µL
	Polymerase-Mix	0,25 µL
	ddH <sub>2</sub> O	add 25 µL

#### 4.1.2 Gezielte Punktmutagenese

Die in dieser Arbeit beschriebenen gezielten Punktmutationen wurden alle mit dem QuickChange Site Directed Mutagenesis Kit (*Stratagene*) durch PCR in die entsprechenden auf Plasmiden kodierten Gene eingeführt. Das Primerdesign erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die PCR, die Aufarbeitung sowie die anschließende Transformation wurden ebenfalls durchgeführt wie vom Hersteller beschrieben.

#### 4.1.3 DNA-Sequenzanalyse

Die verwendete Methode zur DNA Sequenzierung funktionierte nach dem Kettenabbruchverfahren von Sanger. Dabei wurde eine PCR-Reaktion mit nur einem Primer durchgeführt. Dem Reaktionsmix waren dabei bestimmte Mengen von mit basenspezifischen Fluoreszenzfarbstoffen modifizierten ddNTPs beigemischt, die zu Kettenabbrüchen führten. Man erhielt auf diese Weise Ketten unterschiedlicher Länge. Diese DNA Fragmente wurden mit einem ABI Prism 310 Genetic Analyzer (*Applied Biosystems*) durch Kapillarelektrophorese der Größe nach aufgetrennt und anhand der Fluoreszenzfarbstoffe identifiziert. Die Fluoreszenzfarbstoffe emittierten nach der Anregung mit einem Laser Licht einer spezifischen Wellenlänge, welche detektiert wurde.

Für die PCR-Reaktion wurde der ABI Prism dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v2.0 (*Applied Biosystems*) nach Herstellerangaben verwendet. Hierzu wurden pro 1000bp DNA-Templat 100 ng Plasmid-DNA als Templat eingesetzt und insgesamt 5 pmol Primer und 3  $\mu$ L Reaktionsmix zugegeben. Der Reaktionsmix enthielt bereits eine Mischung aus dNTPs, ddNTPs, Puffer sowie eine AmpliTaq-DNA-Polymerase FS. In einem PCR-Reaktionsgefäß wurden die Komponenten gemischt und mit ddH<sub>2</sub>O auf 10  $\mu$ L Endvolumen aufgefüllt. Die PCR-Bedingungen waren wie folgt:

1 Zyklus	96°C	5 min
25 Zyklen	96°C	10 s
	50-55°C	5 s
	60°C	4 min

Nach Beendigung der Reaktion wurden 10  $\mu$ L Wasser zu den Reaktionen zugegeben und diese dann in zuvor vorbereitete 1,5 mL Reaktionsgefäße (2,5  $\mu$ L 3M NaOAc (pH 5,2) und 50  $\mu$ L 98% Ethanol) überführt. Nach dem Mischen wurde 30 min zentrifugiert (13000 U/min bei 4°C), der Überstand vorsichtig abgenommen und das Pellet mit 250  $\mu$ L 70%igem EtOH

gewaschen. Nach dem Trocknen des Pellets bei 37°C wurde in 40 µL HPLC-Wasser resuspendiert, 2 min bei 95°C denaturiert und die fertige Lösung dann blasenfrei in ein Probengefäß überführt.

## 4.2 Genexpression und Protein-Techniken

### 4.2.1 Genexpression

Für die heterologe Expression der klonierten Peptidsynthetasegene in *E. coli* wurde das Expressionssystem „QIAexpressionist“ (*Qiagen*) eingesetzt. Dazu wurden die *E. coli*-Stämme M15 oder SG13009 mit pQE-Vektoren, in die das gewünschte Peptidsynthetasegen insertiert worden war, transformiert. Diese Stämme enthielten bereits das Plasmid pREP4.

Für die Expression wurden zwei Methoden angewandt. In beiden Fällen wurden 400 mL vorgewärmtes 2xYT-Medium (Amp<sup>100</sup>, Kan<sup>25</sup>) mit einer Übernachtskultur der gewünschten Produzentenstämme 1:100 angeimpft. Bei der ersten Variante wurden die Kulturen bei 30°C und 250 upm im Luftschüttler angezogen. Nach Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,6 bis 0,8 wurde die Expression durch Zugabe von 0,2 mL IPTG-Lösung (400 mM) induziert (Endkonzentration 0,2 mM). Bei der zweiten Variante wurden die Expressionskulturen ohne Induktion für 16-18 Stunden bei RT (22-24°C) und 250 upm inkubiert. Danach wurden 0,2 mL IPTG-Lösung (400 mM) zugegeben. In beiden Fällen wurde dann nach der Induktion für weitere zwei bis drei Stunden bei der entsprechenden Temperatur inkubiert. Die entstandenen dichten Zellsuspensionen wurden pelletiert (6000 upm/4°C) und die erhaltenen Pellets in 10 mL FPLC-PufferA (50 mM HEPES, 300 mM NaCl, pH 7,8-8,0) resuspendiert. Diese Suspensionen konnten direkt zum Zellaufschluß weiterverwendet oder bei -20°C zur späteren Aufarbeitung aufbewahrt werden. Der Erfolg der Expression konnte durch SDS-PAGE, wobei Proben vor Induktion mit Proben nach der Induktion verglichen wurden, verfolgt werden. Variante 2 wurde bevorzugt bei Proteinen angewandt, die bei der ersten Variante entweder eine schlechte Löslichkeit zeigten oder aber deren Aktivität sehr niedrig war.

### 4.2.2 Zellaufschluß – Präparation von *E. coli* Rohzelleextrakten

Die resuspendierten *E. coli* Zellen wurden mit Hilfe einer French-Press aufgeschlossen. Durch die schlagartige Expansion der unter einem Druck von 10000 PSI stehenden Zellsuspension wird die Zellwand und die Zellmembran aufgerissen. Der Vorgang von Kompression und Dekompression der Zellsuspension wurde drei mal wiederholt. Um die Proteine zu schonen wurde die gesamte Behandlung bei 4°C durchgeführt. Nach dem Aufschluß wurden die

erhaltenen Suspensionen durch Zentrifugation (17000 upm/ 4°C/ 30 min) von unlöslichen Bestandteilen befreit und der leicht gelbliche Überstand direkt durch IMAC aufgereinigt.

#### 4.2.3 Proteinaufreinigung mittels IMAC - Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie an immobilisierten Metallionen (IMAC) erlaubt eine besonders schnelle Aufreinigung der mit einem His<sub>6</sub>-Tag versehenen rekombinanten Proteine [150-152]. Eine Chelatisierung der immobilisierten Ni<sup>2+</sup>-Ionen der Säulenmatrix durch die Histidinreste des His<sub>6</sub>-Tag's bewirkt die Trennung von den übrigen Proteinen im Zellrohextrakt. Durch Imidazol können die gebundenen Proteine wieder freigesetzt werden. Zur Aufreinigung der Proteine aus 800 mL Zellkultur wurden ca. 1,5 mL Säulenvolumen der Matrix für die FPLC-Säule benötigt. Es wurde eine FPLC-Anlage der Firma Pharmacia verwendet. Zur Aufreinigung wurde eine konstante Fußrate von 0,8 mL/min eingestellt. Nach dem Equilibrieren der Säule mit der Anfangskonzentration an FPLC-Puffer B wurde sie mit dem Zellrohextrakt aus dem Zellaufschluß beladen. Die Auftragung erfolgte in der Regel mit 5% FPLC-Puffer B und es wurde so lange unter gleichen Bedingungen gewaschen bis sich die Absorption bei 280 nm des Eluates der Grundlinie näherte. Durch lineare Erhöhung des Anteils an FPLC-Puffer B in der mobilen Phase (innerhalb 30 Minuten von 5% auf 70%) wurden die gebundenen Proteine anschließend von der Säule eluiert. Die erhaltenen Fraktionen wurden zunächst durch den Bradford-Test [147] auf die Proteinkonzentrationen und danach durch SDS-PAGE auf Reinheit untersucht. Die geeigneten Fraktionen wurden vereinigt und dialysiert. Die Dialyse (2-3 mal gegen das 200-fache Volumen Dialysepuffer) diente zur Entfernung des Imidazols und anderer niedermolekularer Bestandteile sowie zur Einstellung definierter Pufferbedingungen. Nach der Dialyse wurden die Konzentration der einzelnen Proteinlösungen nach der Methode von Bradford bestimmt. Die Proteine konnten entweder direkt biochemischen Untersuchungen unterzogen oder aber aliquotiert und mit flüssigem Stickstoff eingefroren werden. Bei -80°C konnten die meisten Proteine über mehrere Monate ohne signifikanten Aktivitätsverlust gelagert werden.

<b>FPLC-PufferA:</b>	50	mM	HEPES (pH 7,8-8,0)
	300	mM	NaCl
<b>FPLC-PufferB:</b>	50	mM	HEPES (pH 7,8-8,0)
	300	mM	NaCl
	250	mM	Imidazol

<b>Dialysepuffer:</b>	50	mM	HEPES (pH 7,8-8,0)
	100	mM	NaCl
	1	mM	EDTA
	10	mM	MgCl <sub>2</sub>
	0,15	g	DTE pro Liter Dialysepuffer

#### 4.2.4 Sequenzvergleiche von PCP<sup>E</sup>s mit PCP<sup>C</sup>s

Die Proteinsequenzen der miteinander verglichenen PCPs wurden aus der öffentlichen NCBI Datenbank entnommen und stammen alle aus den Biosyntheseoperons für Gramacidin S (Grs; *Bacillus brevis* ATCC 9999) [153], Tyrocidin (Tyc; *Bacillus brevis* ATCC 8185) [15] sowie Bacitracin (Bac; *Bacillus licheniformis* ATCC 10716) [16]. Die 80 Aminosäuren (PCP<sup>E</sup>) und 81 Aminosäuren (PCP<sup>C</sup>) großen Bereiche wurden getrennt voneinander verglichen. Danach wurden durch Vergleich der beiden Sequenzvergleiche Unterschiede identifiziert.

### 4.3 Biochemische Untersuchungen

#### 4.3.1 Assay für die Aktivität der A-Domäne - "ATP-PP<sub>i</sub>-Austausch"

Um die Aktivität der A-Domänen aller aufgereinigten Proteine zu testen, wurden sie in der ATP-PP<sub>i</sub>-Austauschreaktion *in vitro* getestet [154, 155]. Dabei führt die Rückreaktion der reversiblen Aktivierung einer Substrat-Aminosäure als Aminoacyladenylat zum Einbau von radioaktivem [<sup>32</sup>P] aus eingesetztem [<sup>32</sup>P]-Pyrophosphat (PP<sub>i</sub>) in detektierbares [<sup>32</sup>P]-ATP. Dieses ist selektiv aus dem Ansatz abtrennbar, da es im Gegensatz zu Pyrophosphat an Aktivkohle absorbiert wird. Da die ATP-PP<sub>i</sub>-Austauschreaktion die Rückreaktion verfolgt (die Hydrolyse des Adenylates) kann sie kein direktes Maß für die Verfügbarkeit des Adenylates sein. Allerdings ist die Menge der in ATP eingebauten Radioaktivität proportional zur ATP-PP<sub>i</sub>-Austauschrate und somit zur spezifischen Aminosäure-aktivierenden Eigenschaft der Enzymprobe. Als Blindwerte wurden die Messungen identischer Ansätze ohne Substrat-Aminosäure verwendet.

Es wurden jeweils 30 pmol der rekombinanten Enzyme für den Assay eingesetzt. Die eingesetzte Radioaktivität lieferte im Szintillationszähler einen Maximalwert von ca. 100.000 - 250.000 cpm. In der Reaktionslösung (100 µL Endvolumen) befanden sich zudem 1 mM Substrat-Aminosäure (nicht bei der Blindwertbestimmung). Durch die Zugabe von 50 µL Enzymmix zu 50 µL Austauschmix wurde die Reaktion gestartet und nach 5 min



Inkubationszeit bei 37°C durch Zugabe von 0,5 mL Killing-Mix gestoppt. Nach kurzem Vortexieren und einer einminütigen Inkubation auf Eis wurde die suspendierte Aktivkohle durch Zentrifugation pelletiert und der Überstand abgenommen. Danach wurde das Pellet durch Resuspendieren und erneutem Pelletieren in 1 mL *d*H<sub>2</sub>O gewaschen und die Aktivkohle schließlich in 500 µL *d*H<sub>2</sub>O resuspendiert. Diese Suspension wurde dann in 5 mL-Polypropylenröhrchen mit 3,5 mL Szintillationsflüssigkeit vermischt und durch LSC [156] vermessen. Alle benutzten Lösungen wurden auf Eis hergestellt:

<b>Enzymmix:</b>	500	nM	Enzym
	50	mM	HEPES (pH 8,0)
	1	mM	EDTA
	10	mM	MgCl <sub>2</sub>
	100	mM	NaCl
<b>Austauschmix:</b>	0,4	mM	Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub>
	1	mM	Substrat-Aminosäure
	4	mM	ATP
	0,15	µCi	[ <sup>32</sup> P]Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub>
<b>Killingmix:</b>	100	mM	Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub>
	500	mM	H <sub>2</sub> ClO <sub>4</sub>
	1,2	% (w/v)	Aktivkohle (Norit A)

#### 4.3.2 Assay für die Aktivität des PCPs – Aminoacylierungsassay

Der zweite Schritt der Aktivierung von Aminosäuren durch Peptidsynthetasen ist die kovalente Bindung der als Aminoacyladenylat aktivierten Aminosäure an der prosthetischen Gruppe der PCPs [155, 157, 158]. Die Acylierung der Enzyme mit Aminosäuren kann *in vitro* bei 37°C durch Verwendung radioaktiv markierter Substrat-Aminosäuren quantitativ verfolgt werden. Als radioaktive Aminosäuren fanden fast ausschließlich [<sup>14</sup>C]-markierte Aminosäuren Verwendung. Durch die Präzipitation der aminoacylierten Proteine mittels 10% TCA kann der gebundene Anteil der eingesetzten Radioaktivität vom ungebundenen abgetrennt werden [49]. Dieser Aminoacylierungsassay ist somit ein direktes Maß für die Funktionalität des PCPs und seiner funktionellen Interaktion mit der A-Domäne.

In Eppendorf-Reaktionsgefäßen wurden 500 nM Enzym mit 2 mM ATP sowie 200 µM CoASH und 25 nM rekombinanter Ppant-Transferase Sfp (*Bacillus subtilis*) [74] in „Assaypuffer“ 15 min bei 37°C präinkubiert. Die Aminoacylierungsreaktion wurde dann durch Zugabe von 2 µM radioaktiv markierter Substrataminosäure gestartet. Bei Untersuchungen der Zeitabhängigkeit der Bildungsreaktion von aminoacyl-S-Ppant wurde zu definierten Zeitpunkten ein Aliquot von 200 µL abgenommen und die Reaktion durch Zugabe von 1 mL eiskalter 10% TCA durch Ausfällen der Proteine abgestoppt. In den anderen Fällen wurde die Reaktion nach 10-15 Minuten in gleicher Weise abgestoppt. Anschließend wurde 15 min auf Eis inkubiert und 20 min bei 4°C zentrifugiert (13000 upm). Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und die Pellets zweimal mit je 1000 µL eiskalter TCA überschichtet. Zwischendurch wurde jeweils kurz zentrifugiert (2 min, 4°C/ 13000 upm). Die erhaltenen Pellets wurden in 150 µL Ameisensäure resuspendiert und in 5 mL-Polypropylenröhrchen überführt, die 3,5 mL Szintillationsflüssigkeit enthielten. Die Proben konnten nun mittels LSC [156] vermessen werden.

<b>Reaktionsmix:</b>	500	nM	Enzym
	50	mM	HEPES (pH 8,0)
	1	mM	EDTA
	10	mM	MgCl <sub>2</sub>
	100	mM	NaCl
	2	mM	ATP
	25	nM	Sfp
	200	µM	CoASH
	2	µM	radioaktiv markierte Substrataminosäure

#### **4.3.3 Radioassay für den Nachweis der Elongationsreaktion und der Produktabspaltung im System *TycB<sub>2-3</sub>/TycC<sub>1</sub>***

In Eppendorf-Reaktionsgefäßen wurden Aliquots, die 500 nM Enzym 1 (XI, XII, XIII oder XIV) bzw. 2 (XV oder XVI), 2 mM ATP, 200 µM CoASH und 25 nM rekombinanter Ppant-Transferase Sfp (*Bacillus subtilis*) [74] enthielten separat mit ihren jeweiligen Substrataminosäuren (2 µM [<sup>14</sup>C]-L-Phe (450 mCi/mmol), 100 µM L-Asn) bei 37°C präinkubiert. Nach 10 Minuten wurde durch Vermischen gleicher Volumina der getrennten

TycB- und TycC-Derivate enthaltenden Aliquots (Reaktionsmix 1 und 2) die Produktbildungsreaktion gestartet. Zu definierten Zeitpunkten wurden Aliquots von 200  $\mu\text{L}$  abgenommen und die Reaktion durch Zugabe von 1 mL eiskalter 10% TCA durch Ausfällen der Proteine abgestoppt. Die weitere Aufarbeitung und Auswertung erfolgte wie für den Aminoacylierungsassay beschrieben.

<b>Reaktionsmix 1:</b>	500	nM	Enzym 1 (XI, XII, XIII oder XIV)
	50	mM	HEPES (pH 8,0)
	1	mM	EDTA
	10	mM	MgCl <sub>2</sub>
	100	mM	NaCl
	2	mM	ATP
	25	nM	Sfp
	200	$\mu\text{M}$	CoASH
	2	$\mu\text{M}$	radioaktiv markierte Substrataminosäure

**Reaktionsmix 2:** identisch mit Reaktionsmix 1, bis auf:  
500 nM Enzym XV oder XVI (statt Enzym 1) und 100  $\mu\text{M}$  L-Asn (statt 2  $\mu\text{M}$  radioaktiv markierte Substrataminosäure)

#### 4.3.4 Produktbildungsassay im System *TycB<sub>2-3</sub>/TycC<sub>1</sub>*

Für den Nachweis der Produkte im System *TycB<sub>2-3</sub>/TycC<sub>1</sub>* wurden die TycB-Derivate (500 nM) zusammen mit TycC<sub>1</sub>-CAT-Te (jeweils 500nM), 100  $\mu\text{M}$  L- oder D-Phe, 100  $\mu\text{M}$  L-Asn, 200  $\mu\text{M}$  CoASH und 25 nM rekombinanter Ppant-Transferase Sfp (*Bacillus subtilis*) [74] 15 min bei 37°C präinkubiert. Die Produktbildung wurde durch Zugabe von 2 mM ATP gestartet. Die Proben wurden für bis zu zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 mL Methanol abgestoppt, 20 min (13000 upm) zentrifugiert, der Überstand in neue Reaktionsgefäße überführt und im Vakuum bis zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde in 200  $\mu\text{L}$  10% Methanol gelöst. Nach 15 minütiger Zentrifugation bei 13000 upm wurden jeweils 20  $\mu\text{L}$  der erhaltenen Lösung mittels HPLC-MS analysiert. Die Trennung erfolgte auf einer „Reversed Phase“ Säule 250/3-Nucleosil-C18 mit einer Flussrate von 0,3 mL min<sup>-1</sup> und folgendem Gradienten {Puffer A: 0,05 % Ameisensäure/Wasser (v/v);

Puffer B: 0,045% Ameisensäure/Methanol (v/v)}: Beladung 10% Puffer B, linearer Gradient auf 60% Puffer B in 25 min gefolgt von einem Gradienten auf 100% Puffer B in 5 min. Daraufhin wurde die Säule 5 min mit 100 % Puffer B gespült und anschließend wieder mit 10% Puffer B equilibriert. Die Stereochemie der Produkte wurde durch den Vergleich mit Peptidstandards überprüft. Für die Quantifizierung wurde mit verschiedenen Mengen an Standard extern kalibriert.

<b>Reaktionsmix:</b>	500	nM	XI, XII, XIII oder XIV
	500	nM	TycC <sub>1</sub> -CAT/Te (XVI)
	50	mM	HEPES (pH 8,0)
	1	mM	EDTA
	10	mM	MgCl <sub>2</sub>
	100	mM	NaCl
	25	nM	Sfp
	200	μM	CoASH
	100	μM	L- oder D-Phe
	100	μM	L-Asn
	2	mM	ATP

#### 4.3.5 DKP-Bildungsassay

Der DKP-Bildungsassay wurde ausgeführt wie von *Stachelhaus et al.* [52] beschrieben.

Im Falle der quantitativen Untersuchung der Produktbildungsraten der GrsA-CoreT Mutanten (ASI, HSI, HSL und DSL) und ihrem Vergleich mit dem Wildtyp wurde der von *Stachelhaus et al.* beschriebene Assay abgewandelt. Es wurden nicht die Proteinkonzentrationen benutzt, die nach der Methode von Bradford [147] bestimmt worden waren, sondern die Konzentrationen wurden normalisiert auf die jeweilige zuvor bestimmte Aminoacylierungsaktivität (vergleiche Aminoacylierungsassay) der eingesetzten Proteine. Es wurde so verfahren, da die Werte für die Menge an Enzym, welches kovalent aminoacyliert wurde, zwischen verschiedenen Präparationen derselben Enzyme teilweise um bis zu 50% schwankte. Es wurden jeweils 50 nM rekombinantes GrsA (VI) bzw. GrsA-CoreT-Mutanten (VII, VIII, IX oder X) bei 37°C bis zu zwei Stunden in Assaypuffer umgesetzt mit 1,25 μM TycB<sub>1</sub>-CAT (ProCAT), 2,5 mM L- oder D-Phe, 2,5 mM L-Pro und 10 mM ATP. Das Endvolumen betrug 200 μL. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 mL Methanol gestoppt

und es wurde 15 min zentrifugiert (13000upm). Der Überstand wurde in neue Reaktionsgefäße überführt und die Flüssigkeit im Vakuum bis zur Trockne entfernt. Die erhaltenen Pellets wurden in 100  $\mu\text{L}$  30% Methanol (v/v) aufgenommen und Aliquots von je 25  $\mu\text{L}$  durch HPLC untersucht. Die HPLC-Trennung wurde mit einer 70/4 Nucleosil 100-5 C18 Reversed Phase Säule von *Macherey & Nagel* durchgeführt. Es wurde eine isochratische Methode von 30% Puffer B (Puffer A: 0,05% Ameisensäure/Wasser (v/v); Puffer B: 0.045% Ameisensäure/Methanol (v/v)) bei einer Flussrate von 0,6  $\text{mL min}^{-1}$  verwendet. Die gebildete DKP-Menge wurde quantifiziert durch eine externe Detektorkalibrierung mit verschiedenen Mengen an Standard.

<b>Reaktionsmix:</b>	50	nM	VI, VII, VIII, IX oder X
	1,25	$\mu\text{M}$	TycB <sub>1</sub> -CAT (XXVI)
	50	mM	HEPES (pH 8,0)
	1	mM	EDTA
	10	mM	MgCl <sub>2</sub>
	100	mM	NaCl
	25	nM	Sfp
	200	$\mu\text{M}$	CoASH
	2,5	mM	L- oder D-Phe
	2,5	mM	L-Pro
	10	mM	ATP

#### 4.3.6 Epimerisierungsassay

Um die Epimerisierungsaktivität der in dieser Arbeit untersuchten Proteine zu untersuchen, wurden die Enzyme (500 nM) jeweils mit 2 mM ATP sowie 200  $\mu\text{M}$  CoASH und 25 nM rekombinanter Ppant-Transferase Sfp (*Bacillus subtilis*) [74] 15 min bei 37°C präinkubiert. Die Aminoacylierungs- und Epimerisierungsreaktion wurde dann durch Zugabe von 2  $\mu\text{M}$  radioaktiv markierter L-Substrataminosäure gestartet. In einigen Fällen wurde auch [<sup>14</sup>C]-D-Phe verwendet. Zu definierten Zeitpunkten wurde ein Aliquot von 200  $\mu\text{L}$  abgenommen und die Reaktion durch Zugabe von 1 mL eiskalter 10% TCA durch Ausfällen der Proteine abgestoppt. Anschließend wurde 15 min auf Eis inkubiert und 20 min bei 4°C zentrifugiert

(13000 upm). Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und die Pellets zweimal mit je 1000  $\mu\text{L}$  eiskalter TCA überschichtet. Zwischendurch wurde jeweils kurz zentrifugiert (2 min,  $4^\circ\text{C}$ / 13000 upm) Durch je einmaliges Waschen mit 1 mL  $\text{Et}_2\text{O}/\text{EtOH}$  [3:1 (v/v)] und mit 1 mL  $\text{Et}_2\text{O}$  wurden TCA-Reste abgetrennt, die die nun folgende alkalische Thioesterspaltung stören würden. Zwischendurch wurde jeweils für 5 min bei 13000 upm zentrifugiert. Nach dem Trocknen der Pellets wurden die [ $^{14}\text{C}$ ]-markierten enzymgebundenen Aminosäuren durch Zugabe von jeweils 100  $\mu\text{L}$  einer 100 mM Kaliumhydroxidlösung zu den Pellets und 10 minütiger Inkubation bei  $75^\circ\text{C}$  im Heizschüttler (1400 upm) abgespalten. Zu der Reaktionslösung wurde 1 mL Methanol gegeben, vortexiert und 20 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (30 min/13000 upm/  $4^\circ\text{C}$ ) wurde der Überstand in neue Gefäße überführt und im Vakuum die Flüssigkeit entfernt. Anschließend wurden die erhaltenen Pellets in 20  $\mu\text{L}$  50% Ethanol (v/v) resuspendiert und im Falle einer aminoacyl-S-Ppant Epimerisierung auf chirale DC-Platten (HPTLC-Fertigplatten CHIR, Merck) aufgetragen, die mit einem Lösemittelgemisch aus Acetonitril/Methanol/Wasser [4:1:1 (v/v)] entwickelt wurden. Im Falle einer peptidyl-S-Ppant Epimerisierung hingegen erwartet man Diastereomere, die auf Silica gel 60 DC-Alufolien aufgetrennt werden konnten. Diese wurden in einem Lösemittelgemisch aus Butanol/Wasser/Essigsäure/Essigsäureethylester [1:1:1:1 (v/v)] entwickelt. Die Radioaktivität wurde entweder durch eine Autoradiographie auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht oder aber direkt mit einem zweidimensionalen Radioaktivitätsscanner unter Verwendung der mitgelieferten RITA-Software quantifiziert.

**Reaktionsmix:** siehe 4.3.2 „Aminoacylierungsassay“

#### 4.3.7 SNAC-Epimerisierungsassay

Die SNAC-Substrate wurden in verdünnter TFA (pH 3) aufgenommen und bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert um die Hydrolyse zu minimieren. Die SNAC-Epimerisierungsassays wurden mit 500 nM Enzym und 2.5 mM aminoacyl-SNAC oder peptidyl-SNAC als Substrate in einem Endvolumen von 100  $\mu\text{L}$  durchgeführt. Die Reaktionen wurden für bis zu drei Stunden bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Die hydrolytische Spaltung der SNAC-Derivate erfolgte durch Zugabe von 100  $\mu\text{L}$  0,1 M Kaliumhydroxidlösung zu der Reaktionsmischung und zehn minütiger Inkubation bei  $75^\circ\text{C}$ . Nach der Zugabe von 1 mL Methanol wurde vortexiert, 15 Minuten auf Eis inkubiert und 30 min bei 13000 upm/  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Der Überstand wurde in neue Reaktionsgefäße überführt und im Vakuum bis zur Trockne eingengt. Die erhaltenen Pellets

wurden in 10 mM Tris-Puffer (pH 8,0) resuspendiert. Zur anschließenden HPLC-Trennung der D- und L-Aminosäuren wurde eine ChiraDex-Gamma Säule (*Merck, Darmstadt*) verwendet. Vor der Probenaufgabe wurden die Proben „online“ mit FMOC nach Standardverfahren derivatisiert. Die Aminosäure-FMOC-Derivate konnten durch Fluoreszenzdetektion nachgewiesen werden. Für die eigentliche Trennung wurde 0,1 M Natriumacetat (pH 4,4) und Acetonitril im Verhältnis 3:1 (v/v) bei einer Flussrate von 0,55 mL min<sup>-1</sup> verwendet. Die Säulentemperatur betrug konstant 15°C.

Die Assays mit den Tetrapeptiden wurden zum Abstoppen der Reaktion mit 1 mL Methanol versetzt, 15 min auf Eis inkubiert und anschließend 30 min bei 13000 upm/ 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in neue Reaktionsgefäße überführt und im Vakuum bis zur Trockne eingeeengt. Die erhaltenen Pellets wurden in 10 mM Tris-Puffer (pH 8,0) resuspendiert. Die HPLC-Analyse wurde auf einer „Reversed Phase“ Säule 250/3-Nucleosil-C18 (*Macherey & Nagel*) mit Wasser/ 0,1% TFA (v/v) (A) und Acetonitril (B) durchgeführt. Dabei wurde bei einer Flussrate von 0,35 mL min<sup>-1</sup> innerhalb von 30 Minuten die Konzentration von B linear von 20% auf 80% gesteigert.

## 5 Ergebnisse

Die verwendete Nomenklatur und die Schreibweise der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Proteine sind im Anhang A erklärt. Alle Proteine wurden mit römischen Ziffern numeriert. Um die Ergebnisse übersichtlicher zu gestalten, wurde die Herkunft, einschließlich der Amplifikation der benötigten DNA-Fragmente, sowie deren Klonierung und Fusion zu den gewünschten Endkonstrukten nicht hier, sondern ebenfalls in Anhang A beschrieben.

### 5.1 SNAC-Epimerisierungsassays

Ein wichtiger Aspekt dieser Arbeit war die Untersuchung der Substratspezifität von E-Domänen. Da E-Domänen immer ein Bestandteil eines Moduls sind dessen Spezifität durch die A-Domänen determiniert ist, wurde zunächst nach einem Weg gesucht, diese A-Domänenselektivität zu umgehen. Es wurden bereits biochemisch durchgeführte Fehlaminacylierungen mit modifizierten CoASHs durchgeführt [104]. Außerdem war für C-Domänen und Te-Domänen bekannt, dass sogenannte SNACs, die das 3'-Ende eines aminoacylierten-S-Ppant imitieren (vergleiche Abbildung 6-1) als extern zugegebene und frei diffundierbare Substratanaloga umgesetzt werden [92, 94, 159]. Von Polyketidsynthasen (PKS), die ebenfalls multimodular aufgebaut sind und acyl-S-Ppant gebundene Substrate umsetzen, war auch bekannt, dass diese verkürzten Substratanaloga von den Ketosynthasedomänen akzeptiert werden.

So wurde zu Beginn der Arbeit zur Untersuchung der E-Domänenselektivität versucht, aminoacyl-SNACs bzw. peptidyl-SNACs als frei diffundierbare und nicht an das Enzymtemplat gebundene Substratanaloga für E-Domänen einzusetzen, so dass die Spezifitäten der A-Domänen keine Rolle mehr spielen. Zum einen sollte mit dieser Strategie untersucht werden ob E-Domänen eine Spezifität für bestimmte Aminosäuren besitzen, zum anderen hätten sie auch die Untersuchung der Spezifität von aminoacyl-E-Domänen bzw. peptidyl-E-Domänen für aminoacyl- und peptidyl-Substrate erlaubt. Die Synthese der SNAC-Derivate wurde in einer Kooperation mit John Trauger (Harvard Medical School, Boston, USA) durchgeführt. Es wurden die E-Domänen von TycA (TycA-E (XXIII)) und TycB<sub>3</sub> (TycB<sub>3</sub>-E (XXIX)) sowie die kompletten Module (jeweils apo- und holo-Formen) TycA-ATE (V), GrsA-ATE (VI) und TycB<sub>3</sub>-ATE (XIV) mit folgenden SNACs umgesetzt: L-Phe-SNAC, D-Phe-SNAC, L-Phe-L-Pro-L-Phe-D-Phe-SNAC und L-Phe-L-Pro-L-Phe-L-Phe-SNAC (siehe Methoden 4.3.7). Die ersten beiden imitieren die natürlichen Substrate der aminoacyl-

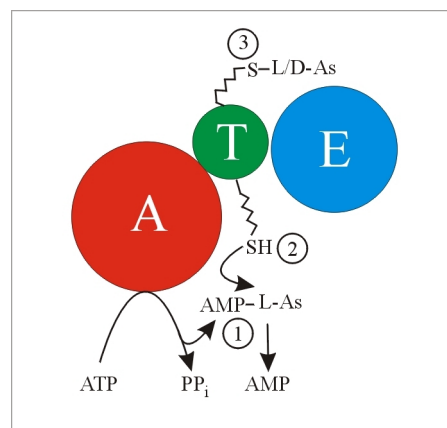


E-Domänen von TycA bzw. GrsA, während die beiden letztgenannten das natürliche tetrapeptidyl-S-Ppant Substrat der peptidyl-E-Domäne von TycB<sub>3</sub> imitieren. In keinem der Fälle konnte aber eine Epimerisierung festgestellt werden (Daten nicht gezeigt), so dass dieser Ansatz nicht weiter verfolgt wurde.

## 5.2 Konstruktion eines Sets aus acht Hybridproteinen des Typs A-PCP/E und A/PCP-E

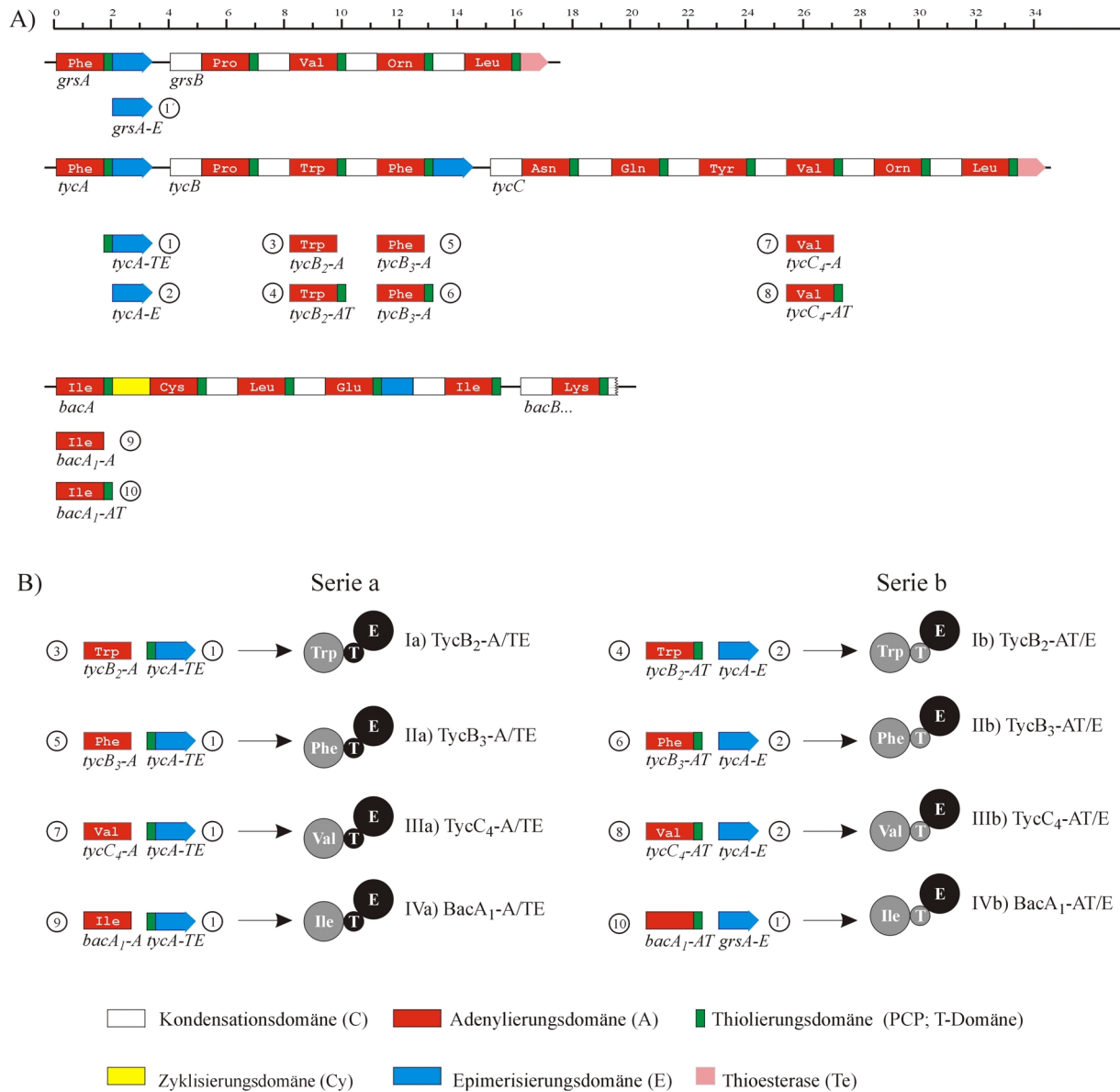
### 5.2.1 Erzeugung und Reinigung der rekombinanten Enzyme

Da offenbar SNAC-Derivate keine Substrate für E-Domänen sind, musste die Selektivität der mit der zu untersuchenden E-Domäne verbundenen A-Domäne geändert werden um die Spezifität von E-Domänen zu untersuchen. Hierfür gab es zwei Möglichkeiten. Es hätte versucht werden können, die Selektivität durch Punktmutationen in der Substratbindungstasche der A-Domänen zu ändern. In dieser Arbeit wurde aber eine andere Strategie, nämlich der Austausch der kompletten A-Domäne bzw. der A-PCP Didomäne eines A-PCP-E Moduls (siehe Abbildung 5-1) verfolgt. Die Beweggründe werden weiter unten diskutiert (vergleiche Diskussion 6.2.2).



**Abbildung 5-1: Reaktionen eines A-PCP-E Moduls**

(1) Die Substrataminosäure wird von der A-Domäne erkannt und unter ATP-Verbrauch als aminoacyl-O-AMP aktiviert. Anorganisches PP<sub>i</sub> wird freigesetzt. (2) Das gebildete aminoacyl-O-AMP wird unter Abspaltung von AMP als Thioester auf dem Ppant-Kofaktor des PCP's gebunden. (3) Das entstandene aminoacyl-S-Ppant wird nachfolgend von der E-Domäne epimerisiert. Eine Mischung aus L- und D-aminoacyl-S-Ppant wird gebildet, wobei durch eine Enantioselektivität der nachfolgenden C-Domäne sichergestellt wird, dass nur das D-Isomer in das Endprodukt eingebaut wird.



**Abbildung 5-2: Übersicht über die Herkunft der DNA-Konstrukte und die Art der Fusionen**

(A) Schematische Darstellung der Biosyntheseoperons von Gramicidin S (*Bacillus brevis* ATCC 9999), Tyrocidin (*Bacillus brevis* ATCC 8185) und des ersten Teils (*bacA*) von Bacitracin (*Bacillus licheniformis* ATCC 10716). Die amplifizierten Genfragmente zur Konstruktion der in (B) gezeigten Fusionsproteine sind zur leichteren Identifikation von 1-10 nummeriert. In (B) ist die Kombinationsstrategie der in (A) gezeigten Genfragmente verdeutlicht. In der Serie a wurden Genfragmente die für A-Domänen kodieren mit dem kombiniert, welches für die PCP-E Domänen von TycA kodiert. Die Fusionsstelle in den resultierenden Fusionsproteinen Ia, IIa, IIIa und IVa des Typs A/PCP-E ist durch den Übergang von hellem grau zu schwarz in den Proteinsymbolen veranschaulicht. In der Serie B wurden entsprechend für A-PCP kodierende Genfragmente mit dem Genfragment der TycA E-Domäne kombiniert. Auch in diesen Fusionsproteinen des Typs A-PCP/E (Ib, IIb, IIIb und IVb) sind in den entsprechenden Proteinsymbolen die Fusionsstellen durch unterschiedliche Schattierungen hervorgehoben.

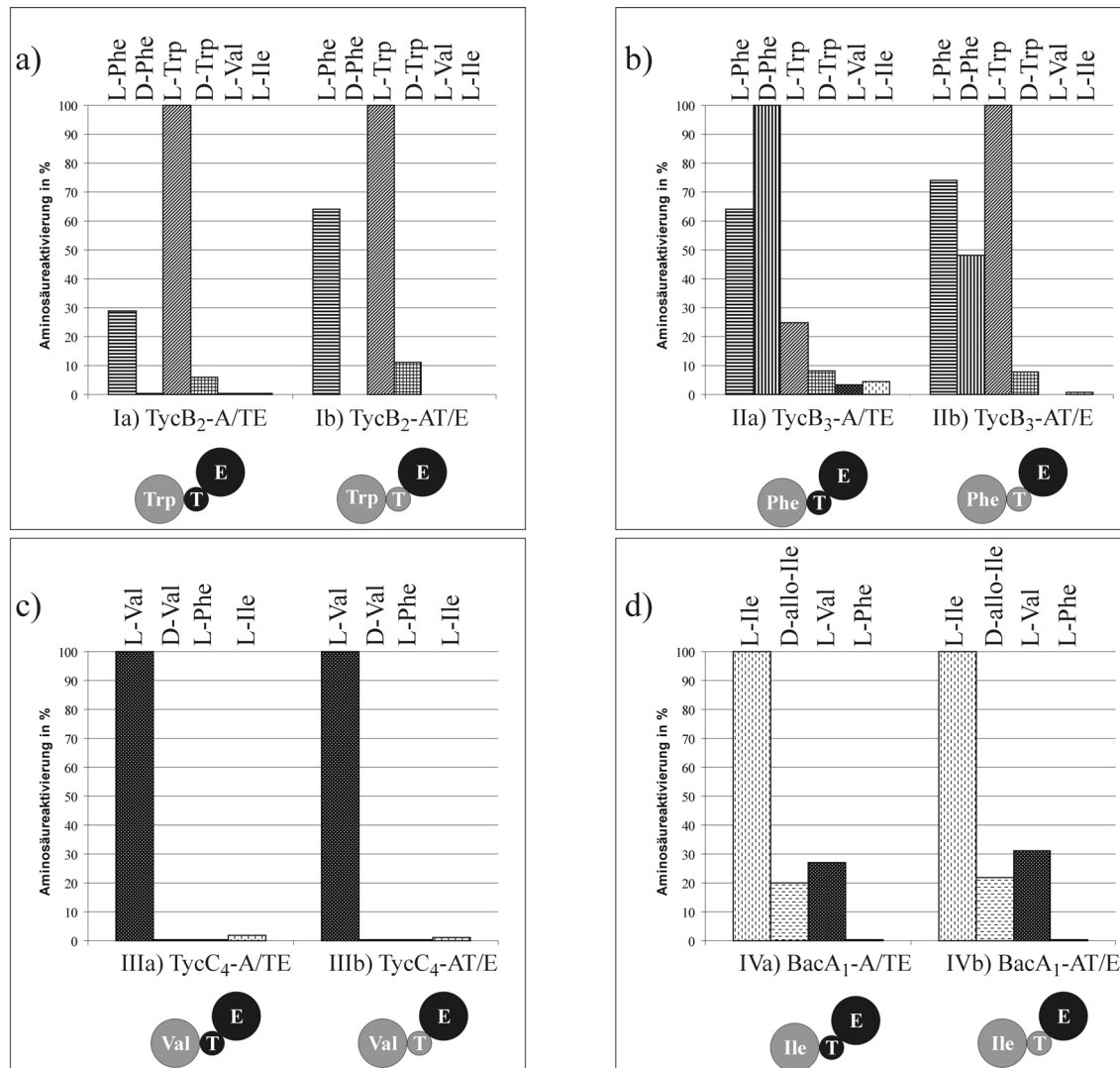
Mit der Fusionsstrategie sollten neben der Frage der E-Domänen-Selektivität zunächst die Fragen nach der generellen Machbarkeit von E-Domänenfusionen sowie nach der geeignetsten Fusionsstelle beantwortet werden.

Hierfür wurden Plasmide erzeugt, welche die für verschiedene Fusionsproteine (insgesamt acht) kodierenden Gene enthielten. Eine Übersicht über die Herkunft der verwendeten Fragmente gibt Abbildung 5-2-a. Die E bzw. PCP-E Domänen von TycA<sub>(Phe)</sub> wurden hierbei mit den A bzw. A-PCP Domänen von TycB<sub>2(Trp/Phe)</sub>, TycB<sub>3(Phe)</sub>, TycC<sub>4(Val)</sub> und BacA<sub>1(Ile)</sub> so kombiniert, dass jeweils Hybridmodule des Typs A-PCP-E entstanden sind: TycB<sub>2</sub>-A/TE (Ia), TycB<sub>2</sub>-AT/E (Ib), TycB<sub>3</sub>-A/TE (IIa), TycB<sub>3</sub>-AT/E (IIb), TycC<sub>4</sub>-A/TE (IIIa), TycC<sub>4</sub>-AT/E (IIIb), BacA<sub>1</sub>-A/TE (IVa) und BacA<sub>1</sub>-AT/E (IVb) (siehe Abbildung 5-2-b). Die Reaktionen, die von A-PCP-E Modulen katalysiert werden, sind in Abbildung 5-1 zusammengefasst. Das letztgenannte Protein (IVb) enthält die E-Domäne von GrsA anstelle der von TycA, welche aber sehr homolog zueinander sind und sich im DKP-Assay gegenseitig ersetzen können [52]. Alle Gene wurden separat in dem heterologen Wirt *E. coli* M15 expremiert. Durch die C-terminale His<sub>6</sub>-tag Fusion konnten die Proteine durch Ni<sup>2+</sup>-Affinitätschromatographie gereinigt werden. Nach der Affinitätschromatographie waren die Proteine für die weiteren biochemischen Untersuchungen ausreichend gereinigt (überprüft durch SDS-PAGE, Daten nicht gezeigt). Die Proteine TycB<sub>2</sub>-A/TE (Ia) und TycB<sub>3</sub>-A/TE (IIa) zeigten bei einer Expression bei 30°C eine sehr niedrige Aminoacylierungsaktivität. Dieses Problem konnte durch die Expression bei niedrigeren Temperaturen (22°C, über Nacht) gelöst werden. Allerdings schienen diese beiden Proteine allgemein recht instabil zu sein, da bei längerer Lagerung bei -80°C die Aminoacylierungsaktivität schnell verloren ging. Alle übrigen Proteine konnten mehrere Monate ohne merklichen Aktivitätsverlust bei -80°C gelagert werden.

### 5.2.2 Aminosäureaktivierung (PP<sub>i</sub>-Austausch)

Die A-Domänen von TycA, TycB<sub>2</sub> und TycB<sub>3</sub> wurden als Phe und Trp aktivierende Domänen beschrieben [15], während TycC<sub>4</sub>-A [15] und BacA<sub>1</sub>-A [16] Val bzw. Ile aktivieren. Um die Fusionsproteine auf die Aktivität der A-Domänen zu überprüfen, wurden alle Proteine dem aminosäureabhängigen ATP-PP<sub>i</sub>-Austauschassay unterzogen (vergleiche Methoden 4.3.1). Wie in Abbildung 5-3 zu sehen ist, aktivierten alle Enzyme ihre kognaten Aminosäuren, was auf eine korrekte Faltung der A-Domänen hindeutet. Bei den Enzymen Ia und Ib sowie IIa und IIb erkennt man geringe Selektivitätsunterschiede, die möglicherweise durch die unnatürliche Fusionsstelle zwischen A-Domäne und PCP induziert werden. So aktivierte Ia L-Phe nur zu

30%, während es von Ib zu 60% aktiviert wurde (jeweils bezogen auf die höchste gemessene Austauschrate). Ila zeigt mit D-Phe die höchste ATP-PP<sub>i</sub>-Austauschrate, I Ib hingegen mit L-Trp als Substrataminosäure.



**Abbildung 5-3: Relative ATP-PP<sub>i</sub>-Austauschaktivität**

(a) Ia und Ib, (b) IIa und IIb, (c) IIIa und IIIb und (d) IVa und IVb. Die jeweils höchste Austauschrate wurde als 100% Austauschaktivität definiert und alle anderen Werte auf diesen Wert bezogen. Der Hintergrund lag bei unter 2% des Maximalwertes. Lediglich im Fall des Proteins IIa lag der Hintergrund bei etwa 10%.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass alle A-Domänen die gewünschten Aminosäuren aktivierten und dass die A-Domänenselektivität offenbar nicht signifikant durch die Einführung der nicht natürlichen Fusionen beeinflusst wurde.

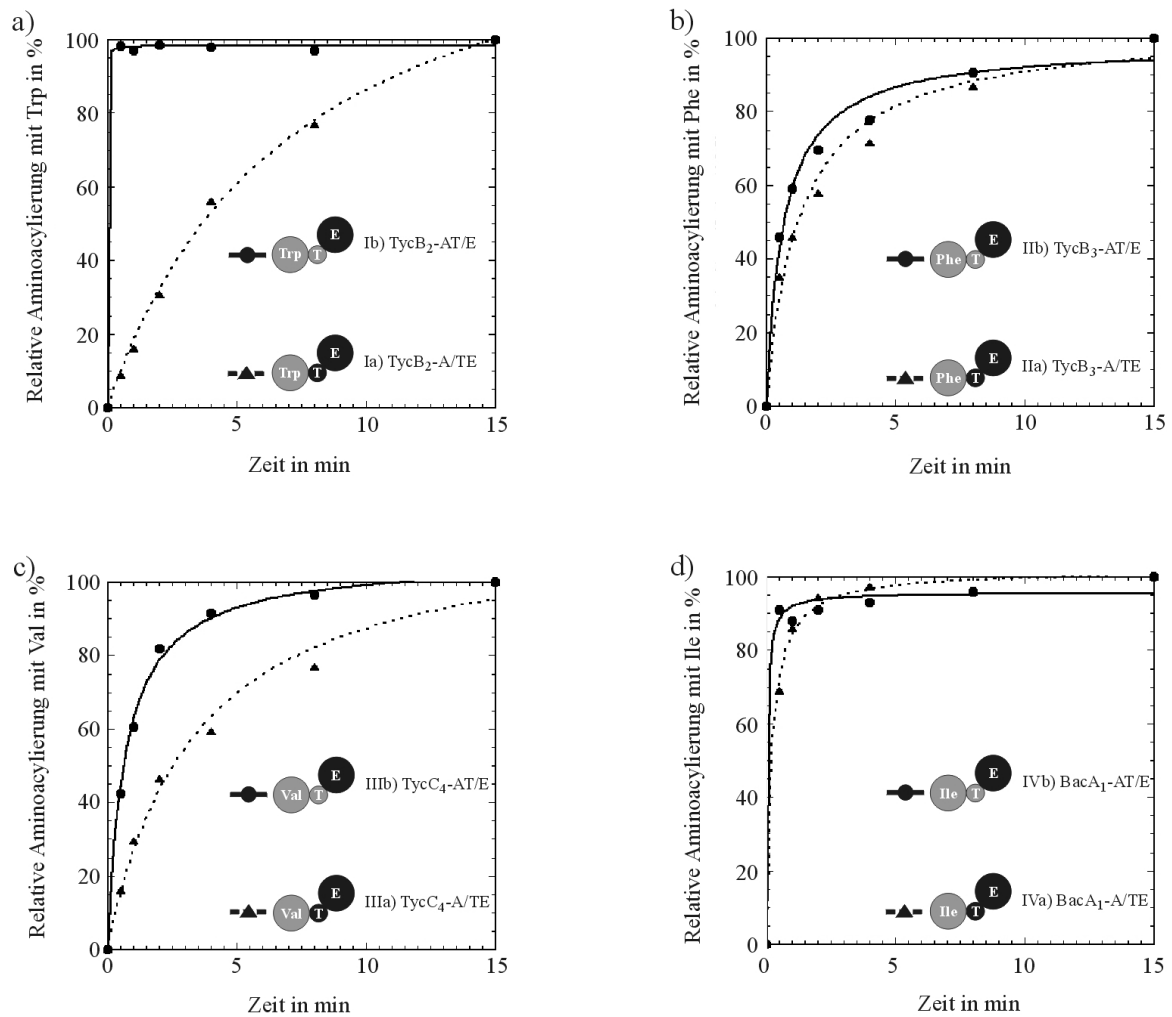
### 5.2.3 Untersuchung der Zeitabhängigkeit der Aminoacylierung

Es ist bekannt, dass verschiedene NRPS Module unterschiedliche Kinetiken für die Aminoacylierung (Aktivierung der Substrataminosäure durch die A-Domäne und kovalente Bindung als aminoacyl-S-Ppant auf dem PCP) aufweisen, aber der Einfluss von Fusionen zwischen A-Domäne und PCP wurde bisher noch nicht untersucht. Das Set der acht Proteine bot die Möglichkeit, vier natürliche A-PCP *in cis*-Interaktionen (Ib, IIb, IIIb und IVb) mit vier nicht-natürlichen (Ia, IIa, IIIa und IVa) zu vergleichen. Hierzu wurden nach der Zugabe der entsprechenden radioaktiv markierten Aminosäure zu den Reaktionsmischungen zu definierten Zeitpunkten Proben entnommen und zum Abstoppen der Reaktion unverzüglich mit 10% TCA versetzt. Anschließend wurde die säurestabile Menge enzymgebundener Radioaktivität durch LSC bestimmt (vergleiche Methoden 4.3.2). Der höchste Wert der erhalten wurde (nach 15 min Inkubationszeit) wurde als 100% Aminoacylierung definiert und alle anderen Werte wurden als relative Aminoacylierungswerte bezogen auf dieses Maximum berechnet. Dies erlaubt eine direkte Vergleichbarkeit der Aminoacylierungseffizienzen. Alle Versuche wurden mindestens dreimal durchgeführt, wobei die Abweichungen der einzelnen Messungen voneinander im Bereich von  $\pm 4\%$  lagen. Abbildung 5-4 zeigt die graphische Darstellung der Ergebnisse. In Tabelle 5-1 wurden die Aminoacylierungs-Halbwertszeiten (Zeiten, die von den einzelnen Proteinen benötigt wurden um 50% der maximalen Aminoacylierung zu erreichen) miteinander verglichen. Bei den beiden Proteinpaaren TycB<sub>3</sub>-A/TE (IIa) und TycB<sub>3</sub>-AT/E (IIb) (vergleiche Abbildung-5-4-b), sowie BacA<sub>1</sub>-A/TE (IVa) und

	A/TE	AT/E
TycB <sub>2</sub> -	240 s	<15 s
TycB <sub>3</sub> -	75 s	40 s
TycC <sub>4</sub> -	150 s	40 s
BacA <sub>1</sub> -	20 s	<15 s

**Tabelle 5-1: Aminoacylierungs-Halbwertszeiten ( $t_{1/2}$ ):** Zeiten, die von den einzelnen Enzymen benötigt wurden um 50% der maximalen Aminoacylierung zu erreichen

BacA<sub>1</sub>-AT/E (IVb) (vergleiche Abbildung 5-4-d) erkennt man nur eine geringfügige Verlangsamung der Aminoacylierungsreaktion im Falle der nicht-natürlichen A-PCP Interaktionen (IIa und IVa) jeweils verglichen mit der natürlichen A-PCP Kombination (IIb und IVb). BacA<sub>1</sub>-AT/E (IVb) wurde sehr effizient mit Ile aminoacyliert ( $t_{1/2} < 15$  s), während die Halbwertszeit der Aminoacylierung bei BacA<sub>1</sub>-A/TE (IVa) für die gleiche Substrataminosäure 20 Sekunden betrug. TycB<sub>3</sub>-A/TE (IIa) benötigte ~75 Sekunden, TycB<sub>3</sub>-AT/E (IIb) ~40 Sekunden um 50% Aminoacylierung des Maximalwertes mit Phe als Substrat



**Abbildung 5-4: Aminoacylierungskinetiken der Fusionsproteine**

(a) TycB<sub>2</sub>-A/TE (Ia) und TycB<sub>2</sub>-AT/E (Ib), (b) TycB<sub>3</sub>-A/TE und TycB<sub>3</sub>-AT/E (IIb), (c) TycC<sub>4</sub>-A/TE (IIIa) und TycC<sub>4</sub>-AT/E (IIIb) und (d) BacA<sub>1</sub>-A/TE (IVa) und BacA<sub>1</sub>-AT/E (IVb). Die holo-Enzyme wurden schnell mit einem fünffachen Überschuss an [<sup>14</sup>C]-Substrataminosäuren versetzt. Zu definierten Zeitpunkten wurden Proben entnommen und diese dann sofort mit 10% TCA abgestoppt. Der höchste erhaltene Wert für die Aminoacylierung wurde auf 100% spezifiziert. Alle anderen Werte sind relative Werte zu diesem Maximalwert und in Prozent angegeben. Dreiecke, Fusionsproteine des Typs A/PCP-E (Abbildung 5-2-B, Serie a); Kreise, Fusionsproteine des Typs A-PCP/E (Abbildung 5-2-B, Serie b).

zu erreichen. Vergleicht man das Paar TycC<sub>4</sub>-A/TE (IIIa) und TycC<sub>4</sub>-AT/E (IIIb) (vergleiche Abbildung 5-4-c) so stellt man fest, dass das Protein mit der nicht-natürlichen A-PCP Interaktion (IIIa) deutlich langsamer mit dem Substrat Val aminoacyliert wurde ( $t_{1/2} \sim 150$ s) als das vergleichbare Protein mit der natürlichen A-PCP Wechselwirkung ( $t_{1/2} \sim 40$ s). Am deutlichsten war der Unterschied bei TycB<sub>2</sub>-A/TE (Ia) und TycB<sub>2</sub>-AT/E (Ib) ausgeprägt

(vergleiche Abbildung 5-4-a). Während das letztgenannte Protein mit der natürlichen A-PCP Kombination bereits nach 30 Sekunden vollständig mit Trp aminoacyliert war, benötigte TycB<sub>2</sub>-A/TE (Ia) ~4 min um 50% des Wertes, der nach 15 Minuten gemessen worden war, zu erreichen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass alle A/PCP-E Fusionsproteine (Ia, IIa, IIIa und IVa) mit geringerer Effizienz aminoacyliert wurden als die vergleichbaren Proteine mit der natürlichen A-PCP Kombination, das heißt mit der Fusionsstelle zwischen PCP und E-Domäne (Ib, IIb, IIIb und IVb). Dies deutet darauf hin, dass A-Domäne und zugehöriges „downstream“ PCP während der Evolution zumindest zu einem gewissen Grade aufeinander optimiert wurden. Alle hier beschriebenen Proteine wurden ausreichend gut aminoacyliert um sie für weitere Untersuchungen im Epimerisierungsassay einsetzen zu können.

#### **5.2.4 Epimerisierungsaktivitäten der Fusionsproteine**

Epimerisierungsdomänen katalysieren die L–nach–D sowie die D-nach-L Umwandlung von aminoacyl-S-Ppant oder peptidyl-S-Ppant Substraten. Im Falle von GrsA wurde gezeigt, dass diese Epimerisierungsreaktion sehr schnell verläuft und zu einem Verhältnis von 2:1 für D-/L-aminoacyl-S-Ppant führt [57, 103].

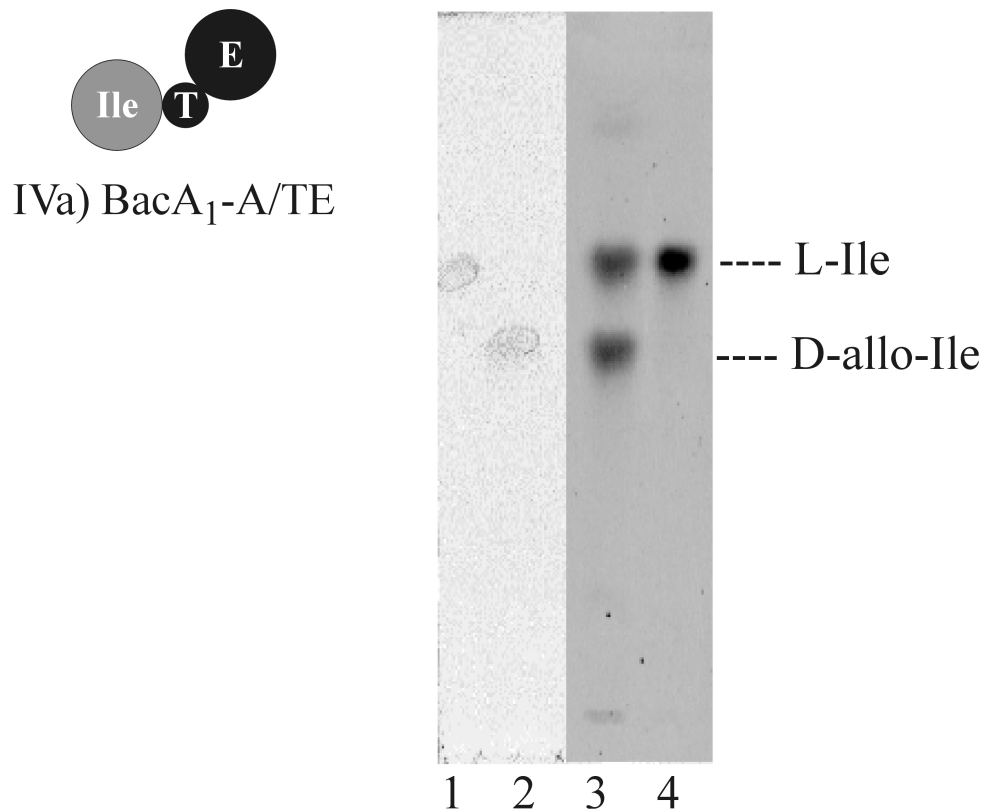
Im Falle der hier vorgestellten acht Fusionsproteine wurde die Funktion der E-Domäne in Abhängigkeit von der Zeit mit L-[<sup>14</sup>C]-markierten Substrataminosäuren untersucht (siehe Methoden 4.3.6). Hierzu wurden zu definierten Zeitpunkten Proben entnommen und die Reaktion mit 10% TCA abgestoppt. Nach der alkalischen Spaltung der aminoacyl-S-Ppant Thioester wurde die jeweilige L/D-Zusammensetzung der abgetrennten Aminosäuren mittels chiraler DC untersucht. Ein Beispiel für eine solche Auftrennung (für eine Reaktionszeit von 15 Minuten) ist für das Protein BacA<sub>1</sub>-A/TE (IVa) auf der Autoradiographie einer DC in Abbildung 5-5 zu sehen. Man erkennt ganz eindeutig, dass nach der Reaktion ein neuer Spot mit dem R<sub>F</sub>-Wert von D-allo-Isoleucin (Vergleich mit der Ninhydrinanfärbung eines nicht radioaktiv markierten Standards) hinzugekommen ist, der in der eingesetzten Substrataminosäure nicht vorhanden war. Die R<sub>F</sub>-Werte aller benutzten L- und D-Aminosäuren erlaubten unter den verwendeten Bedingungen die Quantifizierung mittels einem zweidimensionalen Radioscanner (RITA). Die R<sub>F</sub>-Werte sind in Tabelle 5-2 zusammengefasst. Alle Reaktionen wurden mindestens dreimal durchgeführt. Die Abweichung der einzelnen Messwerte untereinander lag im Bereich von ± 5%.

Die Ergebnisse dieses zeitabhängigen Epimerisierungsassays sind in Abbildung 5-6 dargestellt. Die entsprechenden Daten von TycA-ATE (V), dem Ursprungsmodul der in den

Fusionsproteinen verwendeten E-Domäne, sind in Abbildung 5-7 gezeigt. Die in den Fusionsproteinen TycB<sub>2</sub>-A/TE (Ia) und TycB<sub>2</sub>-AT/E (Ib) enthaltene A- Domäne von TycB<sub>2</sub> ist in der Literatur als Trp aktivierende Domäne beschrieben [15], aktiviert aber

	L-Phe	D-Phe	L-Trp	D-Trp	L-Val	D-Val	L-Ile	D-allo-Ile
R <sub>F</sub> -Wert	0,58	0,45	0,58	0,42	0,53	0,43	0,53	0,44

**Tabelle 5-2: R<sub>F</sub>-Werte der Aminosäuren:** Angegeben sind die R<sub>F</sub>-Werte der Aminosäuren L/D-Phe, L/D-Trp, L/D-Val und L/D-allo-Ile. Es wurden die HPTLC-Fertigplatten CHIR (Merck) verwendet. Das Laufmittel war Acetonitril/Wasser/Methanol [4:1:1 (v/v)]

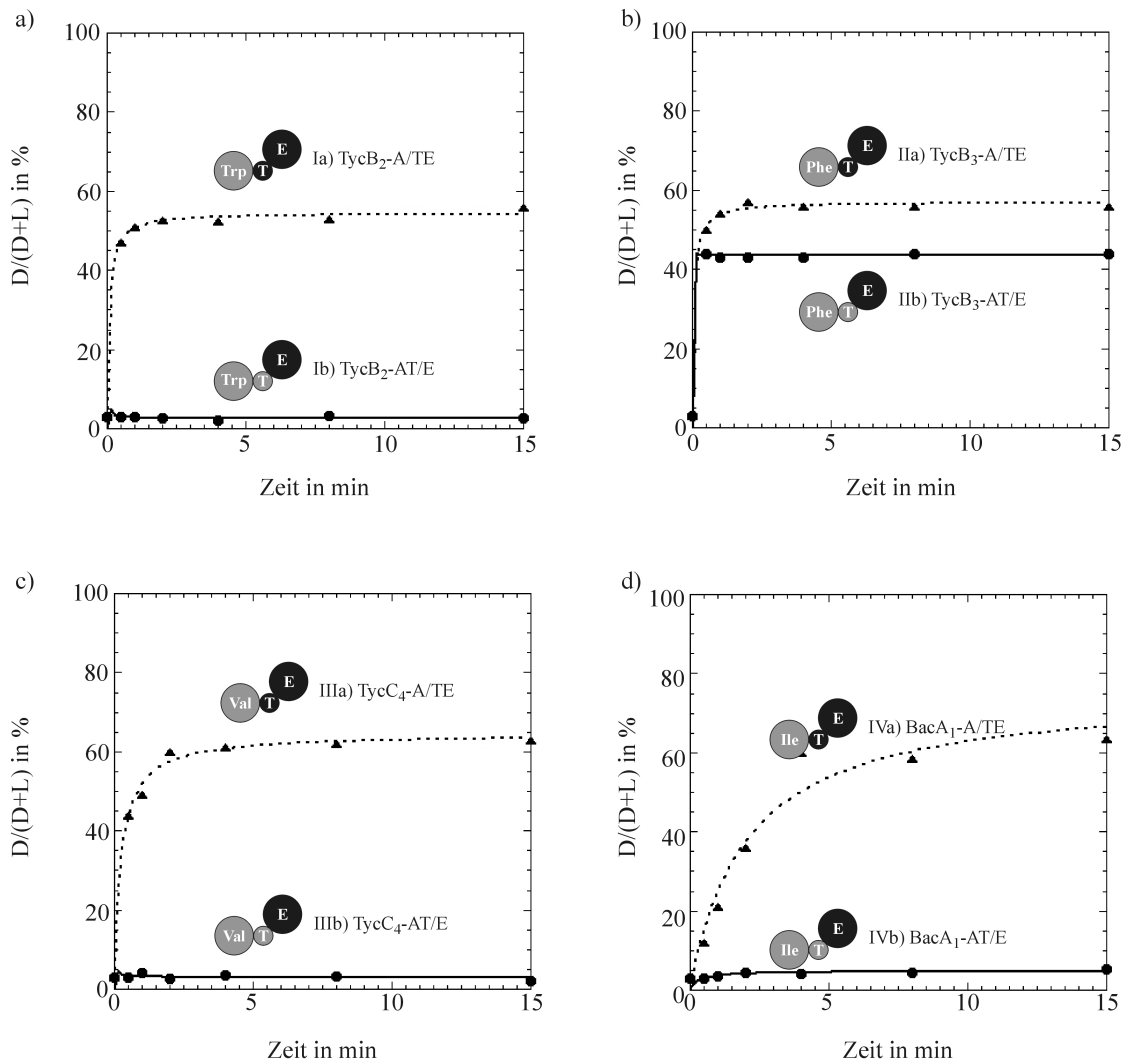


**Abbildung 5-5: Produktanalyse des Epimerisierungsassays von IVa**

In **Spur 1** wurde L-Ile, in **Spur 2** D-allo-Ile als Standards aufgetragen. Da diese Standards nicht radioaktiv markiert waren, wurden sie mit Ninhydrin angefärbt. Spuren 3 und 4 stellen eine Autoradiographie einer DC dar. In **Spur 3** wurden die Produkte, die während des Epimerisierungsassays von IVa (Inkubationszeit hier: 15 Minuten) entstanden sind aufgetragen. Daneben in **Spur 4** ist das eingesetzte radioaktiv markierte Substrat L-Ile zu sehen. Man erkennt, dass nach erfolgter Thioesterspaltung ein neues Produkt (D-allo-Ile) entstanden ist und dass sich die isomeren Formen gut voneinander trennen.



auch mit guter Effizienz Phe [90]. Die Daten für  $[^{14}\text{C}]$ -L-Phe als Substrataminosäure (Daten nicht gezeigt) waren mit den in Abbildung 5-6-a dargestellten Ergebnissen für  $[^3\text{H}]$ -L-Trp vergleichbar.



**Abbildung 5-6: Epimerisierungskinetiken der Fusionsproteine**

(a) Ia und Ib, (b) IIa und IIb, (c) IIIa und IIIb, (d) IVa und IVb. Die Menge an  $[^{14}\text{C}]$ -markierter D-Aminosäure bezogen auf die Gesamtmenge an Radioaktivität nach der TCA-Fällung und der Thioesterspaltung der aminoacyl-S-Ppant Komplexe ist in Abhängigkeit von der Zeit gezeigt: Dreiecke, Fusionsproteine des Typs A/PCP-E (vergleiche Abbildung 5-2-B, Serie a); Kreise, Fusionsproteine des Typs A-PCP/E (vergleiche Abbildung 5-2-B, Serie b). Die Daten für TycA (wildtyp) befinden sich in Abbildung 5-7.

Im Falle der TycB<sub>2</sub>-, TycC<sub>4</sub>- und BacA<sub>1</sub>-Fusionen waren lediglich die Fusionsproteine des Typs A/PCP-E epimerisierungsaktiv (Ia, IIIa und IVa), während TycB<sub>3</sub>-A/TE und TycB<sub>3</sub>-AT/E (IIa und IIb) beide dazu in der Lage waren L-Phe-S-Ppant zu epimerisieren (siehe

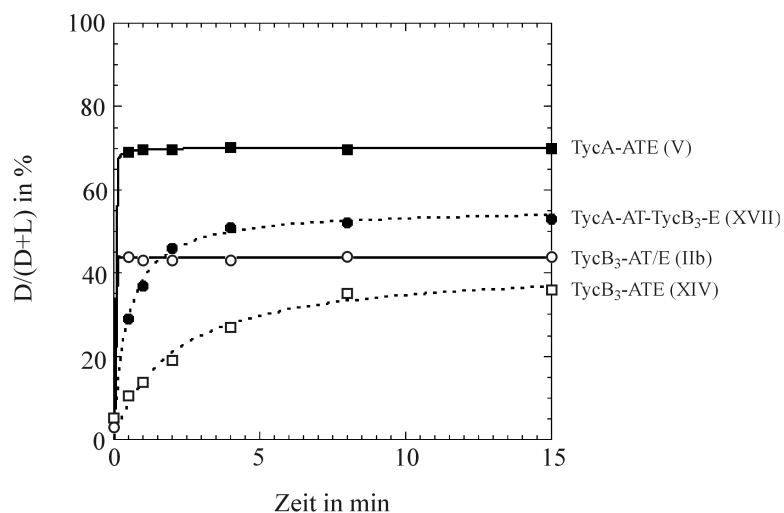
Abbildung 5-6-b). Im Gegensatz zu den nicht epimerisierenden Fusionsproteinen des Typs A-PCP/E enthält TycB<sub>3</sub>-AT/E (IIb) als einzigstes ein PCP, welches natürlicherweise C-terminal mit einer E-Domäne verbunden ist (PCP<sup>E</sup> aus TycB<sub>3</sub>). Die PCPs der inaktiven Fusionsproteine Ib, IIIb und IVb hingegen gehören natürlicherweise zu Modulen, die keine E-Domänen besitzen und sind demnach C-terminal mit C-Domänen verbunden (PCP<sup>C</sup>s). Alle Fusionsproteine, die das PCP<sup>E</sup> von TycA enthielten, erreichten unabhängig von der Substrataminosäure ähnliche L/D-Gleichgewichte von ~60% D-Aminosäure-S-Ppant: TycB<sub>2</sub>-A/TE (Ia), (~54% D-Trp-S-Ppant), TycB<sub>3</sub>-A/TE (IIa) (~57% D-Phe-S-Ppant), TycC<sub>4</sub>-A/TE (IIIa) (~64% D-Val-S-Ppant) und BacA<sub>1</sub>-A/TE (IVa) (~60% D-allo-Ile-S-Ppant). Bei TycB<sub>3</sub>-AT/E (IIb) hingegen, welches das PCP<sup>E</sup> von TycB<sub>3</sub> enthielt, lag das Gleichgewicht bei einem deutlich anderen Wert von ~43%-D-Phe-S-Ppant. Während letzteres das Gleichgewicht bereits zu der kleinsten gemessenen Zeit (30 Sekunden) erreicht hatte, benötigten TycB<sub>2</sub>-A/TE (Ia), TycB<sub>3</sub>-A/TE (IIa) und TycC<sub>4</sub>-A/TE (IVa) etwas länger. Im Gegensatz dazu war BacA<sub>1</sub>-A/TE (IVa) deutlich langsamer, Ile-S-Ppant wurde also offenbar nur mit geringer Effizienz epimerisiert.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die E-Domäne von TycA in der Lage war, die alternativen Substrate L-Trp-S-Ppant, L-Val-S-Ppant und L-Ile-S-Ppant zu epimerisieren, allerdings mit geringerer Effizienz als das natürliche Substrat L-Phe-S-Ppant. Die Methode der Domänenfusion ist also prinzipiell auf E-Domänen anwendbar. Allerdings scheint es so zu sein, dass sie für die Aktivität der E-Domänen ein PCP<sup>E</sup> benötigt wird, was im folgenden noch weiter untersucht wurde.

### **5.2.5 Vergleich der Epimerisierungsaktivitäten von TycA (V), TycB<sub>3</sub> (XIV), TycA-AT-TycB<sub>3</sub>-E (XVII) und TycB<sub>3</sub>-AT/E (IIb)**

Sehr interessant ist der Vergleich der Zeitabhängigkeiten der Epimerisierungsaktivitäten der beiden wildtyp-A-PCP-E-Module TycA-ATE (V) und TycB<sub>3</sub>-ATE (XIV) mit den beiden Fusionsproteinen TycA-AT-TycB<sub>3</sub>-E (XVII) und TycB<sub>3</sub>-AT/E (IIb) (siehe Abbildung 5-7). Diese vier Proteine enthalten E-Domänen, die normalerweise ein aminoacyl-S-Ppant ((V) und (IIb)) oder ein peptidyl-S-Ppant ((XIV) und (XVII)) Substrat epimerisieren, wobei es sich bei V und XIV um die entsprechenden Wildtypmodule, bei IIb und XVII um Fusionsproteine handelt. Wildtyp TycA ist, wie in Abbildung 5-7 gezeigt, ein sehr schnelles aminoacyl-S-Ppant-epimerisierendes Enzym. Das Gleichgewicht zwischen L- und D-Phe-S-Ppant (~70% D-Phe-S-Ppant) war bereits nach 30 Sekunden (kürzeste gemessene Zeit) erreicht. Im Gegensatz dazu benötigte XIV, welches eine E-Domäne enthielt, die natürlicherweise ein

peptidyl-S-Ppant Substrat epimerisiert, sehr viel länger bis das Gleichgewicht zwischen L- und D-Phe-S-Ppant (~43%-D-Phe-S-Ppant) erreicht war. Diese drastische Reduktion der Effizienz konnte durch den Austausch der peptidyl-E-Domäne von TycB<sub>3</sub> gegen die aminoacyl-Epimerisierungsdomäne von TycA (resultierendes Enzym: TycB<sub>3</sub>-AT/E (Iib)) aufgehoben werden. Hingegen führte der Austausch der E-Domäne von TycA (aminoacyl-E-Domäne) gegen die peptidyl-E-Domäne von TycB<sub>3</sub> (TycA-AT-TycB<sub>3</sub>-E (XVII)) zum starken Absinken der Epimerisierungsrate. Es kann bereits an dieser Stelle festgehalten werden, dass peptidyl-E-Domänen offenbar prinzipiell dazu in der Lage sind aminoacyl-S-Ppant Substrate zu epimerisieren. Eine Aussage über die Effizienz kann aber erst weiter unten, wenn die Epimerisierungsaktivität der peptidyl-E-Domäne von TycB<sub>3</sub> mit einem peptidyl-S-Ppant Substrat besprochen wird (vergleiche Ergebnisse 5.4.5), gemacht werden.



**Abbildung 5-7: Vergleich der L-zu-D Umwandlung in den Phe-S-Ppant Komplexen der Proteine Iib, V, XIV und XVII**

Offene Symbole repräsentieren Enzyme, die das PCP von TycB<sub>3</sub> enthalten, geschlossene solche mit dem PCP von TycA. Die Kinetiken von Proteinen, die die E-Domäne von TycA enthalten, sind mit einer durchgezogenen Linie dargestellt, solche mit der E-Domäne von TycB<sub>3</sub> mit einer gepunkteten. Quadrate deuten an, dass es sich um ein wildtyp Enzym handelt, Kreise symbolisieren Fusionsproteine. Die Menge an [<sup>14</sup>C]-D-Aminosäure nach TCA-Fällung und Thioesterspaltung der aminoacyl-S-Ppant Komplexe ist prozentual bezogen auf die Gesamtradioaktivität in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt.

Bemerkenswert ist, dass in XVII die Gleichgewichtseinstellung schneller ablief als in wildtyp TycB<sub>3</sub>, welches die gleiche E-Domäne enthielt. Möglicherweise beeinflussen PCPs also ebenfalls die Epimerisierungsaktivität in entsprechenden NRPS Modulen. Festzustellen ist auch, dass in den getesteten Fusionsproteinen die Beschaffenheit und die Herkunft der PCPs offenbar einen Einfluss auf die Lage des Gleichgewichtes zwischen L- und D-Isomeren haben. Die das PCP von TycA enthaltenden Konstrukte (Ia, IIa, IIIa, IVa, V und XVII) zeigten Gleichgewichte, die zu deutlich höheren Werten für D-Aminosäure-S-Ppant (55-70%) verschoben waren als die, die das PCP von TycB<sub>3</sub> enthielten (40-43%; IIb und XIV) (vergleiche Abbildungen 5-6 und 5-7).

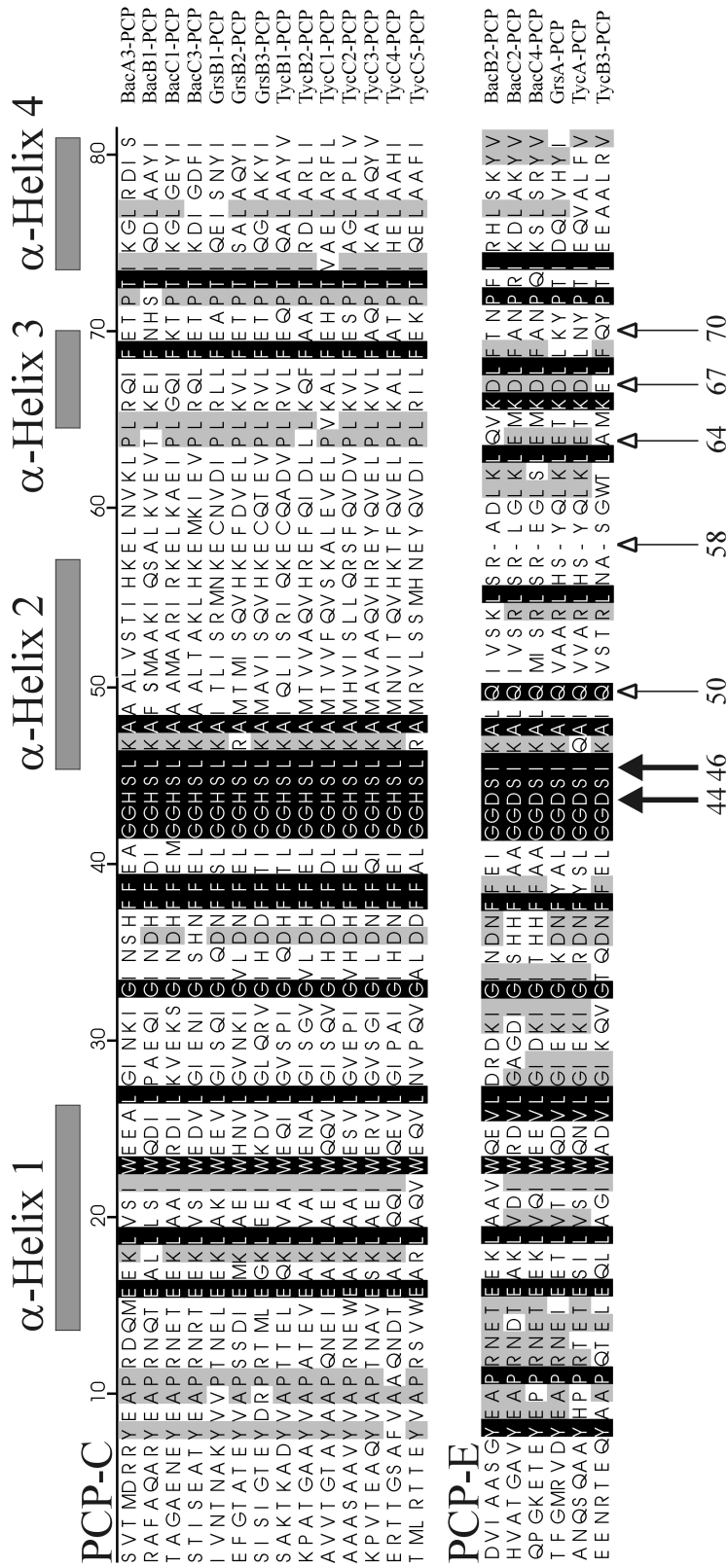
### **5.2.6 Weitere Fusionsproteine des Typs A/PCP-E**

Es wurden noch weitere Fusionsproteine des Typs A/PCP-E konstruiert und untersucht. Diese Fusionsproteine enthielten die A-Domänen von TycB<sub>1</sub> (Pro), TycC<sub>3</sub> (Tyr) und TycC<sub>5</sub> (Orn) jeweils kombiniert mit dem PCP-E aus TycA (resultierende Fusionsproteine: TycB<sub>1</sub>-A/TE (XVIII), TycC<sub>3</sub>-A/TE (XIX) und TycC<sub>5</sub>-A/TE (XX)). Die Expression und Reinigung erfolgte analog zu den Proteinen Ia – IVb. Obwohl alle drei Proteine im PP<sub>i</sub>-Austauschassay (vergleiche Methoden 4.3.1) die gewünschten Aminosäuren aktiviert haben, zeigten sie keinerlei Aminoacylierungsaktivität (vergleiche Methoden 4.3.2), so dass ihre Epimerisierungsaktivität nicht untersucht werden konnte.

## **5.3 Der Einfluss der PCPs auf die Epimerisierung – PCP<sup>E</sup>s versus PCP<sup>C</sup>s**

### **5.3.1 Sequenzvergleiche verschiedener PCPs**

Die biochemischen Daten, die mit den E-Domänen Fusionsproteinen (Ia – IVb und XVII) erhalten worden waren, ließen den Schluss zu, dass es offenbar funktionelle Unterschiede zwischen den verschiedenen Typen von PCPs gibt. Fusionsproteine mit einem PCP<sup>C</sup> zeigten keine Epimerisierungsaktivität (Ib, IIb und IVb), während die, die ein PCP<sup>E</sup> enthielten (Ia, IIa, IIIa, IVa, IIb und XVII), epimerisierungsaktiv waren. Während diese Arbeit entstand wurde von *von Döhren et al.* eine phylogenetische Studie veröffentlicht, die ein von der enzymatischen Nachbarschaft abhängiges Clustern verschiedener PCPs aus NRPS zeigte (C-versus E-Domäne) [160]. Allerdings wurden keine Untersuchungen beschrieben, die konservierte Sequenzunterschiede beider Typen von PCPs zeigten.



**Abbildung 5-8 (vorherige Seite): Sequenzvergleich von PCP<sup>C</sup>s mit PCP<sup>E</sup>s**

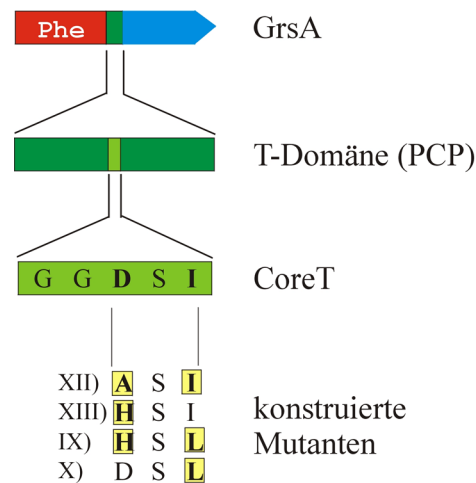
Die PCP-Proteinsequenzen stammen aus den Biosyntheseoperons für Bacitracin [16], Gramicidin S [153] und Tyrocidin [15]. Die grauen Boxen oberhalb des Alignments geben die Positionen der vier  $\alpha$ -Helices an, die in der NMR-Struktur des PCP's aus TycC<sub>3</sub> beschrieben wurden [50]. Die ausgefüllten Pfeile deuten auf die zwei gefundenen Sequenzvariationen im CoreT, die offenen Pfeile auf die übrigen. Die Zahlen unterhalb geben die Position bezogen auf die publizierte NMR-Struktur des TycC<sub>3</sub>-PCP's an. Interessanterweise sind alle signifikanten Variationen in den beiden  $\alpha$ -Helices zwei und drei lokalisiert.

Um zu überprüfen, ob sich der beobachtete funktionale Unterschied auch auf Primärsequenzebene widerspiegelt, wurden die Proteinsequenzen verschiedener PCP<sup>C</sup>s und PCP<sup>E</sup>s miteinander verglichen. Die Ergebnisse dieses Sequenzvergleiches sind in Abbildung 5-8 dargestellt. Es wurden folgende auffällige Unterschiede in den Primärsequenzen von PCP<sup>E</sup>s verglichen mit PCP<sup>C</sup>s gefunden: (1) Die Sequenz des CoreT lautet bei PCP<sup>E</sup>s GGDSI im Gegensatz zu GGHSL bei PCP<sup>C</sup>s, (2) ein hochkonserviertes Gln an der Position 50 (die Numerierung bezieht sich auf die publizierte NMR-Struktur des TycC<sub>3</sub>-PCP [50]), (3) eine Deletion einer Aminosäure an Position 58, (4) keine konservierten Pro- und Glu-Reste an den Positionen 64 und 70 sowie (5) ein saurer Rest an Position 67 (Asp oder Glu) anstelle eines hydrophoben Restes. Interessanterweise befinden sich alle diese konservierten Sequenzunterschiede innerhalb der  $\alpha$ -Helices zwei und drei von PCPs.

**5.3.2 Einfluss von Mutationen im CoreT von PCPs auf die Epimerisierungsaktivität**

Da eindeutig zwei Typen von PCPs gefunden wurden, die aufgrund ihrer Primärsequenzen und ihrer unterschiedlichen Interaktion mit C- und E-Domänen unterschieden werden können, wurde im Weiteren versucht, die Bedeutung der Sequenzunterschiede im CoreT biochemisch zu charakterisieren. In diesem wichtigen Bereich von PCPs, der das invariante Serin zur Bindung des Kofaktors Ppant enthält, wurden bei PCP<sup>E</sup>s zwei Aminosäureaustausche (H44D und L46I) im Vergleich zu den PCP<sup>C</sup>s gefunden (vergleiche Abbildung 5-8). Als Modellsystem wurde die häufig für die Charakterisierung der E-Domäne benutzte [52, 57, 103, 104, 161] Initiationssynthetase der Gramicidin S Biosynthese GrsA [153] verwendet, welche die Domänenstruktur A-PCP-E besitzt und homolog zu TycA ist. Es wurden vier GrsA-CoreT Mutanten hergestellt (GrsA-ASI (VII), GrsA-HSI (VIII), GrsA-HSL (IX), GrsA-DSL (X); siehe Abbildung 5-9). Bei Mutante VII wurde die häufig zur Charakterisierung essentieller Reste verwendete Methode der „Alanin-Mutation“ angewandt, bei Mutante VIII handelt es sich um eine Doppelmutante, die das CoreT eines PCP<sup>C</sup>s zeigt.

Nach der Aufreinigung der Mutanten wurden die biochemischen Grundfunktionen (ATP-PP<sub>i</sub>-



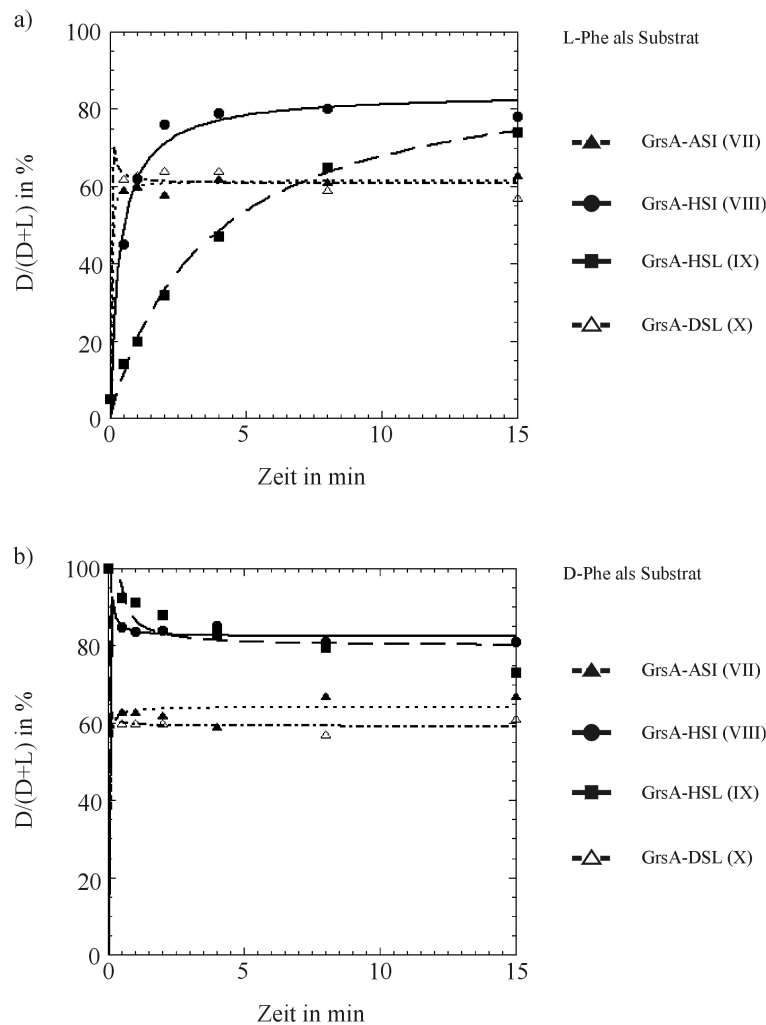
**Abbildung 5-9: GrsA-CoreT-Mutanten**

Die Initiationsynthetase der Gramacidin S Biosynthese GrsA ist schematisch gezeigt. Das PCP mit dem darin befindlichen CoreT (wildtyp GrsA : GGDSI) sind stark vergrößert. Es wurden folgende CoreT Mutanten konstruiert: GrsA-ASI (VII), GrsA-HSI (VIII), GrsA-HSL (IX) und GrsA-DSL (X).

Austausch und Aminoacylierungsassay; vergleiche Methoden 4.3.1 und 4.3.2) getestet. Wie erwartet wurden L- und D-Phe aktiviert. Die Aminoacylierung der PCPs war für wildtyp GrsA-ATE (VI) und alle Mutanten (XII, XIII, IX und X) bereits nach 30 Sekunden (kürzeste gemessene Zeit) vollständig (Daten nicht gezeigt). Innerhalb des messbaren Zeitrahmens hatte die Mutation im CoreT also keinen Einfluss auf die Aminoacylierungsreaktion.

Anschließend wurden Epimerisierungsassays sowohl mit [ $^{14}\text{C}$ ]-L- als auch mit [ $^{14}\text{C}$ ]-D-Phe als Substrataminosäure durchgeführt. Nachdem die Reaktionen zu definierten Zeitpunkten mit 10% TCA gestoppt worden waren, wurden die [ $^{14}\text{C}$ ]-Phe-S-Ppant Komplexe von überschüssigem Substrat befreit, gewaschen und die Thioester mit 0,1 M Kaliumhydroxidlösung hydrolysiert. Das abgespaltene [ $^{14}\text{C}$ ]-Phe wurde dann auf chiralen DC-Platten in L- und -D-Phe getrennt und mit einem zweidimensionalen Radioscanner (RITA) quantifiziert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5-10 zusammengefasst. Für die Mutanten GrsA-ASI (VII) und GrsA-DSL (X) konnte kein Unterschied zum Wildtyp festgestellt werden. Die Gleichgewichte waren im Rahmen der Messungenauigkeit mit dem Wildtyp (63% D-Phe-S-Ppant) vergleichbar und waren bereits nach 30 Sekunden vollständig eingestellt. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass unterhalb von 30 Sekunden Unterschiede zu sehen wären, wenn man „Rapid-Quench“-Techniken verwenden würde, da GrsA ein sehr effizientes Enzym ist und das Gleichgewicht hier bereits in weniger als zwei Sekunden eingestellt ist [103]. Die Möglichkeit zu „Rapid-Quench“-Untersuchungen war

jedoch nicht gegeben. Die beiden verbleibenden Mutanten, GrsA-HSI (VIII) und GrsA-HSL (IX) zeigten aber ganz klar ein anderes Verhalten. Die Gleichgewichte waren zu ~80% D-Phe-S-Pant verschoben und die Zeit, die bis zum Erreichen dieser Gleichgewichte verging, war sehr viel länger als beim Wildtyp. Dabei war die Doppelmutante IX, die das CoreT eines PCP<sup>C</sup> enthält, eindeutig am langsamsten.



**Abbildung 5-10: Epimerisierungskinetiken der GrsA-CoreT Mutanten VII, VIII, IX und X**

(a) Die L-zu-D und (b) die D-zu-L Umwandlung der Phe-S-Pant Komplexe der GrsA-CoreT Mutanten VII, VIII, IX und X ist dargestellt (GrsA-ASI (VII), gefüllte Dreiecke; GrsA-HSI (VIII), gefüllte Kreise; GrsA-HSL (IX), gefüllte Quadrate; GrsA-DSL (X), offene Dreiecke)

### 5.3.3 DKP-Bildungsaktivität der GrsA-CoreT-Mutanten verglichen mit dem Wildtyp

GrsA ist die Initiationssynthetase der Gramacidin S Biosynthese in *B. brevis* [153]. Es wurde beschrieben, dass GrsA (VI) *in vitro* D-Phe auf TycB<sub>1</sub>-CAT (XXVI), das erste Modul der



Tyrocidin-Synthetase B [15], transferrieren kann [52]. Das gebildete lineare D-Phe-L-Pro wird dann durch einen nicht-katalysierten nukleophilen Angriff der freien Aminogruppe des Phenylalanins auf die Carbonylgruppe des Thioesters als cyclisches D-Phe-L-Pro-DKP vom Enzym abgespalten (vergleiche Abbildung 2-9).

In Vorversuchen wurde gefunden, dass die gebildete Produktmenge von der TycB<sub>1</sub>-CAT (XXVI) Konzentration abhängig war. Bei einer Erhöhung der Menge von XXVI und konstanter Menge GrsA-ATE (VI) im Assay stieg die Produktbildungsrate an. Bei einem Verhältnis von etwa 20:1 (XXVI:VI; Enzymkonzentrationen normiert auf die Aminoacylierungsaktivität) wurde keine signifikante Steigerung der Produktbildungsraten mehr festgestellt. Umgekehrt konnten bei einer Erhöhung der Menge an GrsA-ATE (VI) und konstanter Menge an XXVI keine erhöhten Produktbildungsraten festgestellt werden. Daraufhin wurde in allen weiteren Assays XXVI in einem 25-fachen Überschuss verglichen mit GrsA (VI) bzw. der GrsA-CoreT-Mutanten (VII, VIII, IX und X) eingesetzt, was garantierte, dass die gemessenen Produktbildungsraten nicht durch die TycB<sub>1</sub>-CAT (XXVI) Menge limitiert waren.

Der DKP-Assay (siehe Methoden 4.3.5) wurde mit GrsA (VI) und den Mutanten separat mit L- und D-Phe als Substrate durchgeführt. Die Produktbildungsraten unter den Reaktionsbedingungen sind in Tabelle 5-3 zusammengefasst. Die Werte für  $k_{\text{obs}}$  lagen im Falle von GrsA (VI) bei  $69,6 \pm 1,3$

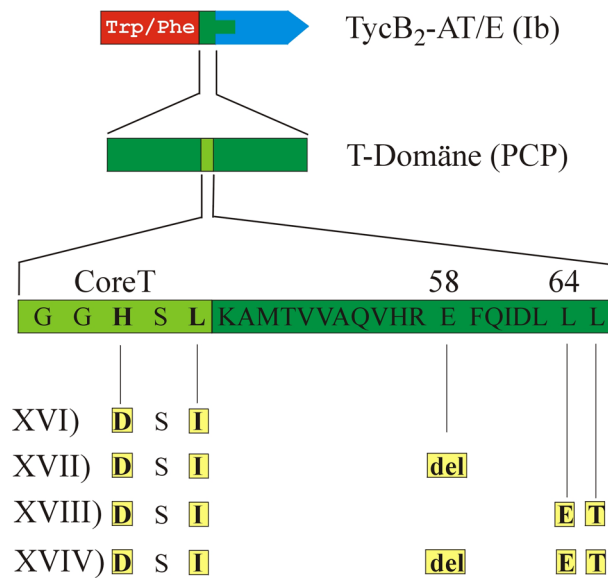
Enzym	$k_{\text{obs}}$ in $\text{min}^{-1}$ mit L-Phe	$k_{\text{obs}}$ in $\text{min}^{-1}$ mit D-Phe
VI) GrsA (wt)	$69.6 \pm 1.3$	$65.5 \pm 0.7$
VII) GrsA-ASI	$18.5 \pm 0.3$	$61.2 \pm 2.7$
VIII) GrsA-HSI	$13.7 \pm 0.4$	$53.7 \pm 3.7$
IX) GrsA-HSL	$16.0 \pm 0.4$	$57.7 \pm 4.5$
X) GrsA-DSL	$54.4 \pm 1.1$	$65.2 \pm 1.7$

**Tabelle 5-3: DKP-Bildungsraten von GrsA und der CoreT Mutanten**

mit L-Phe und bei  $65,5 \pm 0,7$  mit D-Phe als Substrat. GrsA-DSL (X) zeigte ähnliche Produktbildungsraten wie der Wildtyp ( $54,4 \pm 1,1$  mit L-Phe und  $65,2 \pm 1,7$  mit D-Phe als Substrat). Die anderen drei Mutanten (VII, VIII und IX) zeigten mit L-Phe niedrigere Produktbildungsraten (GrsA-ASI (VII)  $18,5 \pm 0,3$ ; GrsA-HSI (VIII)  $13,7 \pm 0,4$ ; GrsA-HSL (IX)  $16,0 \pm 0,4$ ) während mit D-Phe zum Wildtyp vergleichbare Werte erhalten wurden (GrsA-ASI (VII)  $61,2 \pm 2,7$ ; GrsA-HSI (VIII)  $53,7 \pm 3,7$ ; GrsA-HSL (IX)  $57,7 \pm 4,5$ ).

### 5.3.4 Mutationen in *TycB<sub>2</sub>-AT/E (Ib)*

Da ein Einfluss der Mutationen im CoreT von GrsA auf die Epimerisierungsreaktion nachgewiesen werden konnte, wurde versucht, in das PCP<sup>C</sup> eines inaktiven Fusionsproteins Mutationen einzuführen, die eine Aktivierung der E-Domäne bewirken sollten. Für diese Mutationsexperimente wurde *TycB<sub>2</sub>-AT/E (Ib)*, welches keinerlei Epimerisierungsaktivität zeigte, ausgewählt, da es neben Trp auch Phe aktiviert, was der natürlichen Aktivität der fusionierten E-Domäne von *TycA* entspricht.

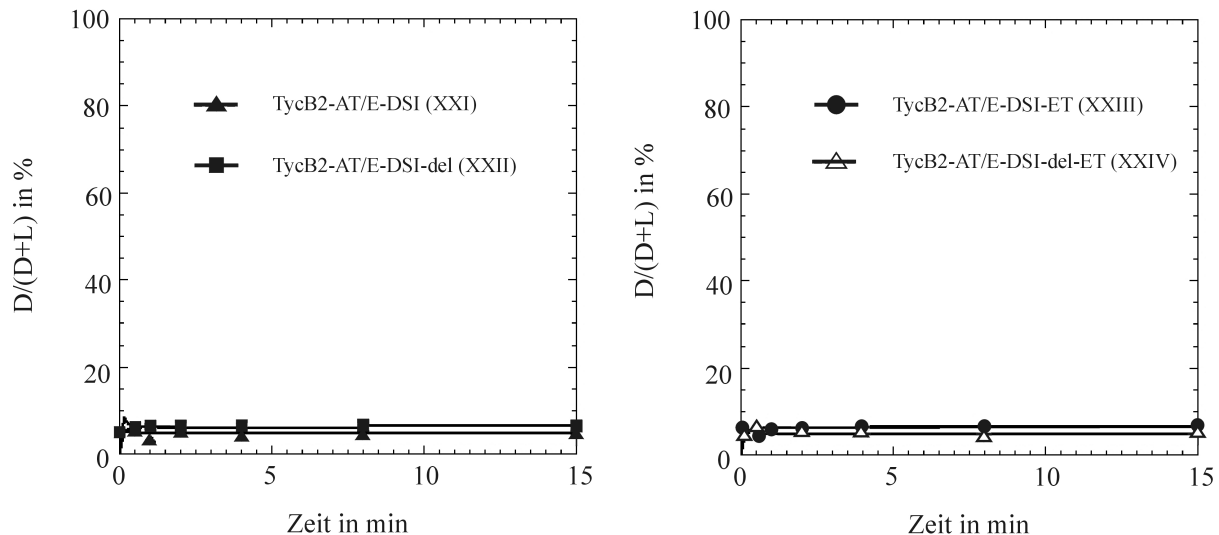


**Abbildung 5-11 Mutanten des Fusionsproteins *TycB<sub>2</sub>-AT/E (Ib)***

Das Fusionsprotein Ib ist schematisch dargestellt. Das PCP mit dem darin befindlichen CoreT (wildtyp PCP<sup>C</sup> von *TycB<sub>2</sub>*: GGHSL) sowie dem sich C-terminal daran anschließenden Teil sind stark vergrößert. Es wurden folgende Mutanten konstruiert: *TycB<sub>2</sub>-AT/E-DSI (XXI)*, *TycB<sub>2</sub>-AT/E-DSI-del (XXII)*, *TycB<sub>2</sub>-AT/E-DSI-ET (XXIII)* und *TycB<sub>2</sub>-AT/E-DSI-del-ET (XXIV)*

Es wurden die Mutanten *TycB<sub>2</sub>-AT/E-DSI (XXI)*, *TycB<sub>2</sub>-AT/E-DSI-del (XXII)*, *TycB<sub>2</sub>-AT/E-DSI-ET (XXIII)* und *TycB<sub>2</sub>-AT/E-DSI-del-ET (XXIV)* hergestellt. Die eingeführten Mutationen sind in Abbildung 5-11 in einer Übersicht schematisch dargestellt. Die Aufreinigung der His<sub>6</sub>-tag Proteine erfolgte über Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitätschromatographie. Das Protein XXIV mit den meisten Mutationen war, wenn es bei 30°C expremiert wurde, unlöslich (überprüft durch SDS-PAGE), was auf Faltungsprobleme hindeutet. Generell wurde beobachtet, dass die Löslichkeit der Proteine abnahm je mehr Mutationen eingeführt wurden. Insbesondere die Deletion (del) schien kritisch zu sein. Da alle Mutanten bei einer längeren

Expression bei 23°C bessere Löslichkeiten und höhere Aktivitäten besaßen, wurde generell bei dieser erniedrigten Temperatur expremiert. Unter diesen Bedingungen war auch mehr als die Hälfte des Proteins XXIV löslich.



**Abbildung 5-12: Epimerisierungskinetiken der TycB<sub>2</sub>-AT/E-Mutanten XXI, XXII, XXIII und XXIV**

Die L-zu-D Umwandlung der Phe-S-Ppant Komplexe der TycB<sub>2</sub>-AT/E-Mutanten XXI, XXII, XXIII und XXIV ist dargestellt (TycB<sub>2</sub>-AT/E-DSI (XXI), gefüllte Dreiecke; TycB<sub>2</sub>-AT/E-DSI-del (XXII), gefüllte Quadrate; TycB<sub>2</sub>-AT/E-DSI-ET (XXIII), gefüllte Kreise; TycB<sub>2</sub>-AT/E-DSI-del-ET (XXIV), offene Dreiecke). Wie man sehen kann, ist keine der Mutanten dazu in der Lage gewesen Phe zu epimerisieren.

Alle Proteine aktivierten L-Phe und L-Trp im ATP-PP<sub>i</sub>-Austauschassay und wurden mit den entsprechenden Aminosäuren aminoacyliert (vergleiche Methoden 4.3.1 und 4.3.2; Daten nicht gezeigt), so dass sie im Epimerisierungsassay eingesetzt werden konnten. Wie in Abbildung 5-12 gezeigt ist, besaß aber keine der vier Mutanten eine Epimerisierungsaktivität. Die alleinige Mutation des CoreT als auch die Einführung weiterer Mutationen C-terminal von diesem waren für eine Aktivierung also nicht hinreichend.

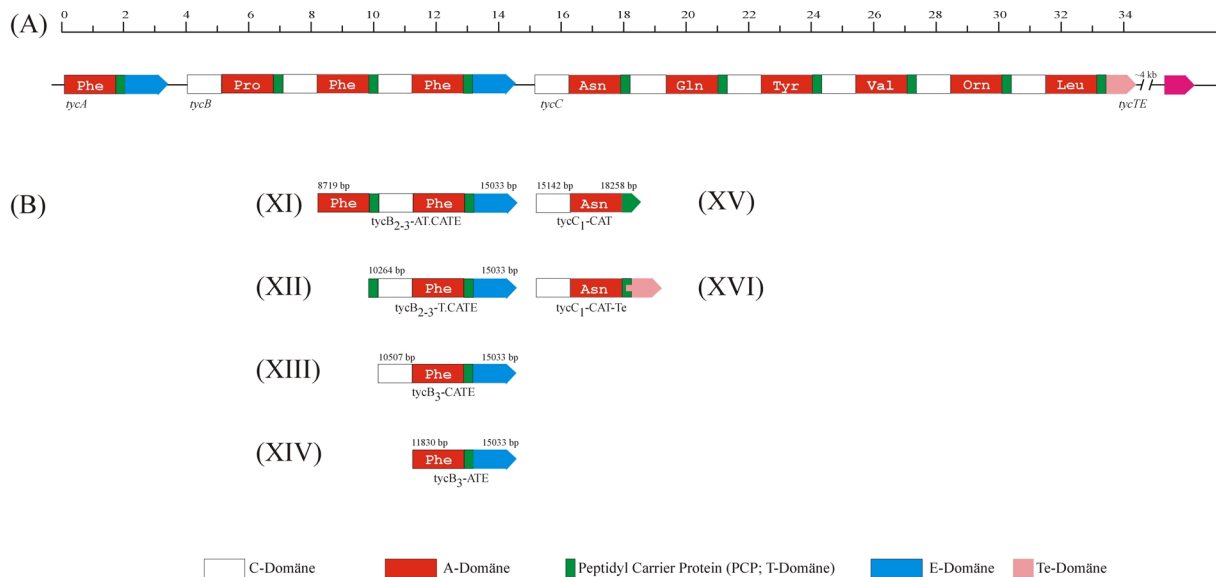
## 5.4 Entwicklung eines *in vitro* Systems zur Charakterisierung einer peptidyl-Epimerisierungsdomäne

E-Domänen von Elongationsmodulen epimerisieren peptidyl-S-Ppant Substrate, das heißt, eine Epimerisierung findet erst nach erfolgter Kondensation mit dem elektrophilen Akzeptor statt [101, 102]. Die Entwicklung eines *in vitro* Systems zur Charakterisierung einer peptidyl-

E-Domäne sollte dazu dienen zu klären, ob es in der Tat zwei Typen von E-Domänen gibt oder ob die Einbettung in die enzymatische Umgebung zu der beobachteten Reaktionsfolge führt. Die Bedingung für ein Funktionieren des entwickelten Systems war, dass Elongationsmodule prinzipiell initiationsfähig sind, was ebenfalls nicht bekannt war. In diesem Zusammenhang war eine weitere Fragestellung die mit diesem System beantwortet werden sollte, was Elongationsmodule von Initiationsmodulen unterscheidet und welche Mechanismen eine interne Mis-Initiation verhindern.

#### 5.4.1 Konstruktion und Reinigung der rekombinanten Enzyme

Zur Beantwortung der offenen Fragen wurden insgesamt sechs rekombinante Enzyme konstruiert, die alle auf den Tyrocidin-Synthetasen aus *Bacillus brevis* basierten [15]. Vier Proteine wurden durch das Einführen verschieden langer N-terminaler Verkürzungen des C-Terminus von TycB erhalten (siehe Abbildung 5-13): TycB<sub>2-3</sub>-AT.CATE (XI), TycB<sub>2-3</sub>-T.CATE (XII), TycB<sub>3</sub>-CATE (XIII) und TycB<sub>3</sub>-ATE (XIV). Die verbleibenden zwei Proteine besitzen ihren Ursprung im N-Terminus von TycC (vergleiche Abbildung 5-13). TycC<sub>1</sub>-CAT (XV) wurde durch Deletion aller C-terminalen Module von TycC erhalten und das



**Abbildung 5-13: Übersicht über die Herkunft der Enzyme für das entwickelte *in vitro* System**

(A) Schematische Darstellung des Tyrocidin-Operons aus *Bacillus brevis* ATCC8185. Tyrocidin wird von drei Peptidsynthetasen synthetisiert: TycA (122 kDa), TycB (405 kDa) und TycC (724 kDa), die von den zugehörigen Genen *tycA*, *tycB* und *tycC* kodiert werden [15]. (B) Die klonierten Genfragmente sind entsprechend ihren natürlichen Lokalisationen im Tyrocidin-Operon darunter dargestellt. Direkt oberhalb eines jeden Fragmentes ist die natürliche Position in Basenpaaren (bp) angegeben.

Fusionsprotein TycC<sub>1</sub>-CAT/Te (XVI) wurde erzeugt, indem die Te-Domänen kodierende Region von TycC<sub>6</sub> direkt an das 3'-Ende der TycC<sub>1</sub>-CAT (XV) kodierenden DNA kloniert wurde.

Alle Proteine wurden nach getrennter Expression in dem heterologen Wirt *E. coli* als His<sub>6</sub>-tag Fusionen erhalten und konnten durch Ni<sup>2+</sup>-Affinitätschromatographie aufgereinigt werden. Alle sechs Proteine, die so gereinigt worden waren, besaßen eine Reinheit von über 90% (überprüft durch SDS-PAGE), was für die weitere biochemische Charakterisierung ausreichend war.

#### 5.4.2 Aminosäureaktivierung (PP<sub>i</sub>-Austausch)

Die Spezifitäten und Aktivitäten der A-Domänen der aufgereinigten Proteine wurde mittels ATP-PP<sub>i</sub>-Austauschassay (vergleiche Methoden 4.3.1) überprüft. Die A-Domänen von TycB<sub>2</sub> und TycB<sub>3</sub> wurden beide als Trp und Phe aktivierend beschrieben [15, 90]. Da die späteren Epimerisierungsassays sowohl mit L- als auch mit D-Phe durchgeführt werden sollten, wurden beide Aminosäuren in diesem Assay getestet. Ebenso wurde die Adenylierungsaktivität von L-Trp und L-Asn für alle Proteinen untersucht.

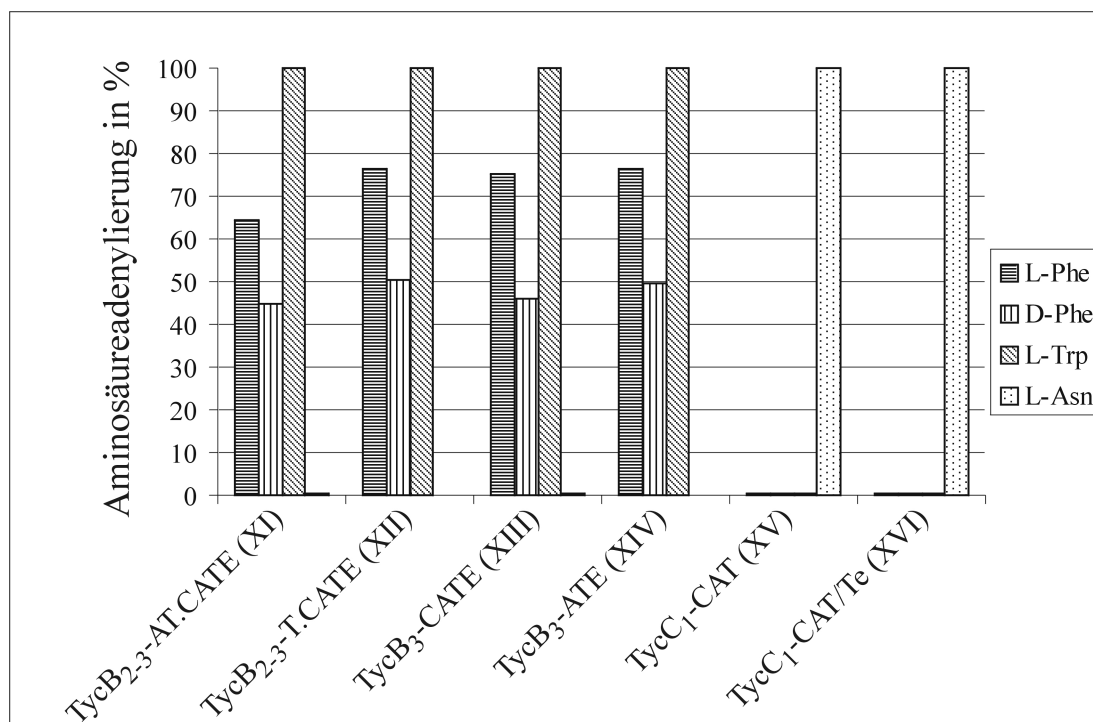


Abbildung 5-14: Relative ATP-PP<sub>i</sub>-Austauschaktivität der NRPS-Module XI, XII, XIII, XIV, XV und XVI

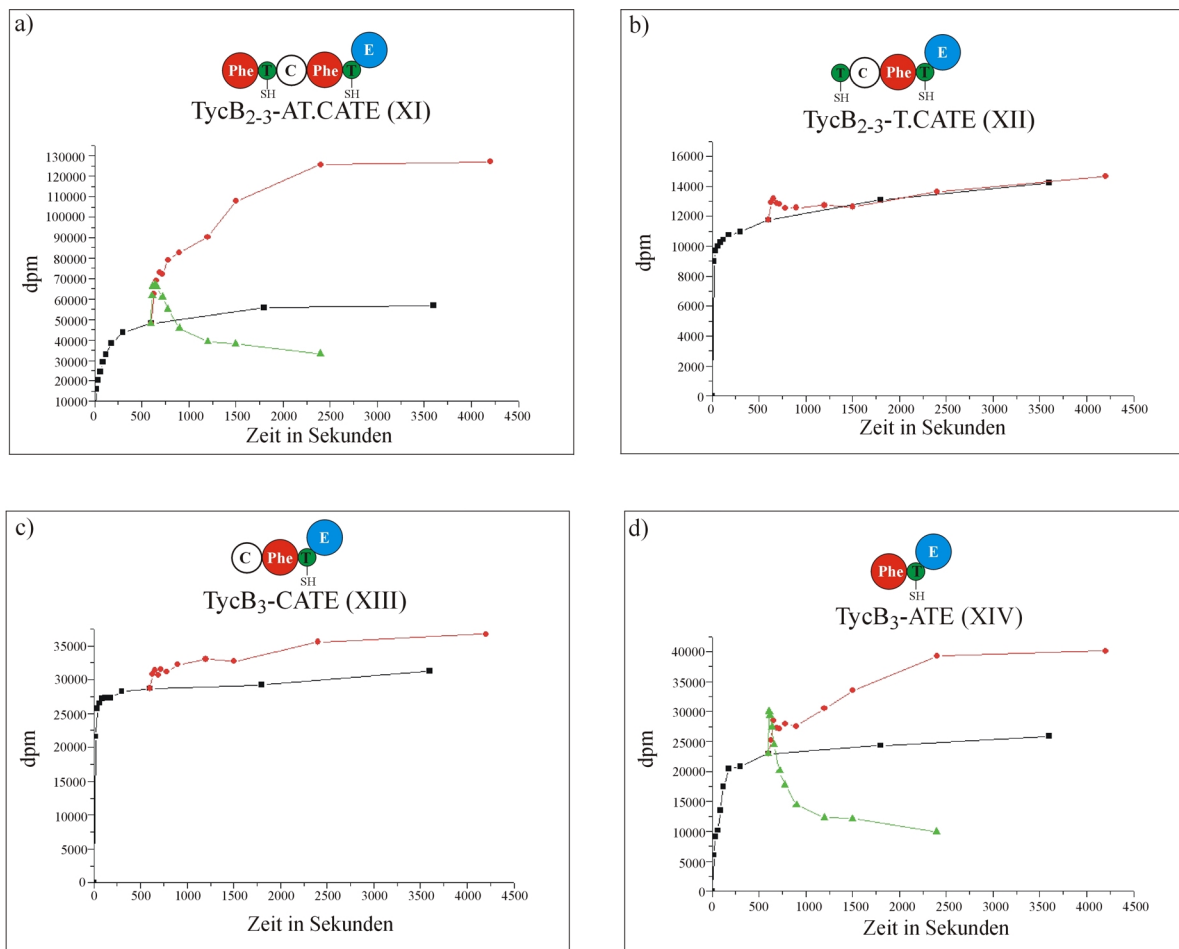
Die höchste Austauschrate eines Moduls wurde gleich 100% definiert (sie lag jeweils bei ca. 100000 dpm). Alle anderen Werte sind relative Werte zu diesem Maximum. Der Hintergrund lag bei unter 1%.

Wie in Abbildung 5-14 zu sehen ist, aktivierten die Enzyme TycB<sub>2-3</sub>-T.CATE (XII), TycB<sub>3</sub>-CATE (XIII) und TycB<sub>3</sub>-ATE (XIV) wie erwartet L-Phe, D-Phe und L-Trp, nicht jedoch L-Asn. Im Falle des dimodularen Enzyms XI, welches zwei sehr ähnliche A-Domänen in sich vereint, konnte keine Aussage über deren Einzelaktivitäten getroffen werden. Das Aktivierungsmuster gleicht den anderen drei TycB-Derivaten. Vergleicht man die Daten des PP<sub>i</sub>-Austausches der Fusionsproteine Ia und Ib, die nur die A-Domäne von TycB<sub>2</sub> enthalten (siehe Abbildung 5-3-b), so ist davon auszugehen, dass die erste A-Domäne des Dimoduls XI kein D-Phe und D-Trp aktiviert, sondern nur die entsprechenden L-Isomere. TycC<sub>1</sub>-CAT (XV) und TycC<sub>1</sub>-CAT/Te (XVI) aktivierten selektiv L-Asn, nicht jedoch Phe oder Trp.

#### ***5.4.3 Untersuchung der Aminoacylierungskinetiken sowie des Phe-Transfers von den TycB-Derivaten auf TycC***

Um die Aminoacylierungskinetiken sowie einen möglichen Phe-Transfer von den TycB-Derivaten XI, XII, XIII und XIV auf TycC<sub>1</sub>-CAT (XV) oder TycC<sub>1</sub>-CAT/Te (XVI) zu detektieren, wurden die TycB-Derivate XI, XII, XIII und XIV mit [<sup>14</sup>C]-L-Phe inkubiert. Der zeitliche Verlauf der Aminoacylierungsreaktion wurde durch Probennahme zu definierten Zeitpunkten verfolgt. Die entnommenen Proben wurden sofort durch Zugabe 10%iger TCA gequenchet und nach dem Waschen wurde die säurestabile enzymgebundene Radioaktivität mittels LSC quantifiziert (vergleiche Methoden 4.3.3). Alle in Abbildung 5-15 gezeigten Daten sind Mittelwerte aus je 3-5 Versuchsreihen. Die Abweichung lag in der Regel bei unter 3%. Wie in dieser Abbildung zu sehen ist, war die Aminoacylierung bei allen Enzymen nach zehn Minuten weitestgehend vollständig. In gleicher Weise zehn Minuten präinkubierte Proben wurden nun mit TycC<sub>1</sub>-CAT (XV) oder TycC<sub>1</sub>-CAT/Te (XVI), welche entsprechend mit L-Asn prä-aminoacyliert worden waren, vermischt. Nun wurden wieder zu bestimmten Zeitpunkten Proben entnommen, die Reaktion durch sofortige Zugabe von 10% TCA abgestoppt und nach entsprechender Aufarbeitung die enzymgebundene Menge an Radioaktivität mittels LSC quantifiziert. Die so erhaltenen Werte wurden mit denen für die TycB-Derivate XI, XII, XIII und XIV verglichen, die ohne Zugabe eines TycC<sub>1</sub>-Abkömmlings erhalten worden waren (vergleiche Abbildung 5-15). Für den Fall, dass markiertes Phe (ein Phe-Phe Dipeptid im Falle des dimodularen Proteins XI als Donor) auf TycC<sub>1</sub>-CAT (XV) übertragen wird und dass die nun wieder zur Verfügung stehende Bindestelle des TycB-Derivates (zwei im Falle des Dimoduls XI) wieder mit markiertem Phe aminoacyliert wird, sollte man davon ausgehen, dass die Gesamtmenge enzymgebundener Radioaktivität im Vergleich zu den Proben ohne TycC<sub>1</sub>-CAT (XV) ansteigt. Bei der Zugabe von TycC<sub>1</sub>-CAT/Te

(XVI) anstelle von XV wird man ebenfalls einen Anstieg der gebundenen Radioaktivität erwarten, je nachdem ob und wie effizient die fusionierte Te-Domäne die Produktabspaltung katalysiert und welcher Schritt der geschwindigkeitsbestimmende für die Gesamtreaktion ist. Sollte das eingesetzte [ $^{14}\text{C}$ ]-L-Phe dann vollständig in die Produkte eingebaut sein, so wird man einen deutlichen Abfall der enzymgebundenen Radioaktivität erwarten, der im Idealfall bis zur Hintergrundaktivität zurückgeht.



**Abb. 5-15: Aminoacylierungs- und Transferkinetiken der TycB<sub>3</sub> Derivate**

(a) TycB<sub>2.3</sub>-AT.CATE (XI), (b) TycB<sub>2.3</sub>-T.CATE (XII), (c) TycB<sub>3</sub>-CATE (XIII) und (d) TycB<sub>3</sub>-ATE. Eine schematische Darstellung der Donorenzyme befindet sich jeweils oberhalb einer jeden Abbildung. Die Akzeptormodule TycC<sub>1</sub>-CAT (XV) oder TycC<sub>1</sub>-CAT/Te (XVI) wurden mit L-Asn vorbeladen und dann zu den jeweiligen vorinkubierten (10 Minuten) TycB<sub>3</sub>-Reaktionsmischungen dazugegeben. L-Asn wurde in großem Überschuss eingesetzt, L-Phe war [ $^{14}\text{C}$ ]-markiert und nur in geringem Überschuss verfügbar. Die Menge säurestabiler enzymgebundener Radioaktivität ist in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt: schwarze Quadrate, ohne Zugabe eines Akzeptormoduls; rote Kreise, nach Zugabe von TycC<sub>1</sub>-CAT (XV); grüne Dreiecke, nach Zugabe von TycC<sub>1</sub>-CAT/Te (XVI).

Für die beiden Enzyme TycB<sub>2-3</sub>-AT.CATE (XI) und TycB<sub>3</sub>-ATE (XIV) wurde ein starker Anstieg der enzymgebundenen Radioaktivität nach der Zugabe von TycC<sub>1</sub>-CAT (XV) festgestellt (siehe Abbildungen 5-15-a,d), was darauf hindeutet, dass diese Enzyme (XI und XIV), die keine N-terminale C-Domäne besitzen, eine Elongationsreaktion initiieren können. Ungefähr 25 Minuten nach der Zugabe des Akzeptorproteins V wurde in beiden Fällen ein stabiles Maximum erreicht, was darauf hindeutet, dass kein oder nur vernachlässigbar wenig Produkt vom Enzymtemplat durch Hydrolyse abgespalten wird. Wurde der gleiche Versuch hingegen mit den TycB-Derivaten XII oder XIII durchgeführt, war ein solcher deutlicher Anstieg nicht zu erkennen (siehe Abbildungen 5-15-b,c). Offensichtlich waren diese TycB-Derivate (XII und XIII), die eine N-terminale C-Domäne besitzen, nicht dazu in der Lage, die Substrataminosäure Phe auf TycC<sub>1</sub> zu transferieren. Sie waren also nicht initiationsfähig. TycB<sub>2-3</sub>-AT.CATE (XI) und TycB<sub>3</sub>-ATE (XIV), die offensichtlich dazu in der Lage waren, Phe-Phe bzw. Phe auf TycC<sub>1</sub> zu transferieren wurden zusätzlich in gleicher Weise mit TycC<sub>1</sub>-CAT/Te (XVI) untersucht um die Aktivität der fusionierten Te-Domäne zu testen. Wie im Falle einer katalysierten Produktabspaltung erwartet, nahm in beiden Fällen die Menge säurestabiler enzymgebundener Radioaktivität stark ab, nachdem sie zuvor direkt nach dem Mischen der Proteine leicht angestiegen war (vergleiche Abbildungen 5-15-a,d). Die Te-Domäne katalysiert also offenbar wie gewünscht die Produktabspaltung, so dass es dieses neue *in vitro* System erlaubt mehrere Reaktionszyklen zu untersuchen.

#### **5.4.4 Produkt Identifizierung und Quantifizierung mittels HPLC-MS**

Zur Identifizierung der entstandenen Produkte und zur Quantifizierung der Initiationsaktivitäten der TycB-Derivate XI, XII, XIII und XIV wurde ein HPLC-MS-Assay entwickelt (siehe Methoden 4.3.4). Dieser Assay wurde mit verschiedenen Substraten für die TycB-Derivate XI, XII, XIII und XIV durchgeführt (L-Trp, L-Phe und D-Phe; alle sind alternative Substrate der A-Domänen von TycB<sub>2</sub> und TycB<sub>3</sub> (vergleiche Abbildung 5-14)). Erwartet wurden das Dipeptid D-Phe-L-Asn (Masse 279 Da) mit den Enzymen TycB<sub>2-3</sub>-T.CATE (XII), TycB<sub>3</sub>-CATE (XIII) und TycB<sub>3</sub>-ATE (XIV), sowie das Tripeptid L-Phe-D-Phe-L-Asn (Masse 426 Da) mit dem Dimodul TycB<sub>2-3</sub>-AT.CATE (XI) als Donatoren und L-Phe als Substrat. Der Austausch von Phe zu Trp sollte die entsprechenden Trp-Asn Di- (Masse 318 Da) und Trp-Trp-Asn Tripeptide (Masse 504 Da) liefern. Die Identifizierung und die Stereochemie des Dipeptides L/D-Phe-L-Asn und des Tripeptides L-Phe-L/D-Phe-L-Asn erfolgte durch Massenanalyse und dem Vergleich mit Peptidstandards. Durch Injektion definierter Mengen an Standard wurden Kalibriergeraden erstellt, anhand derer die

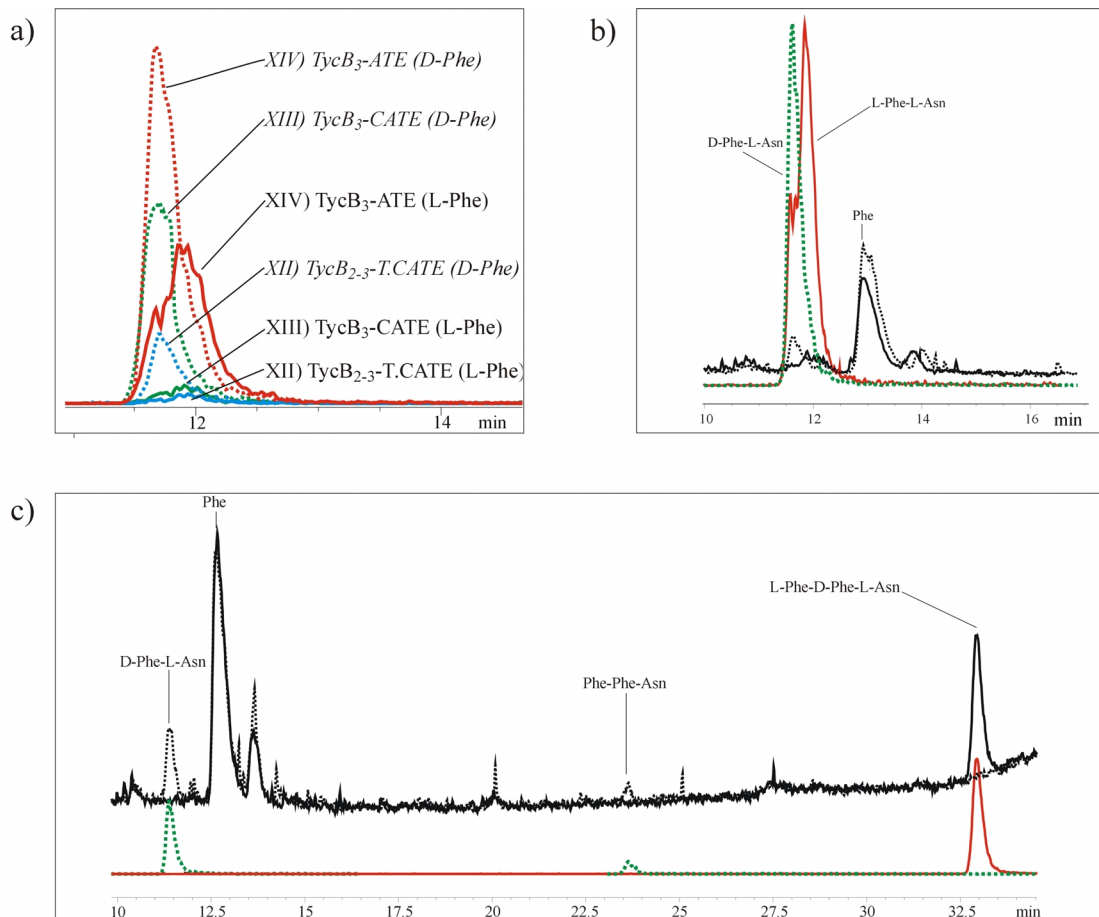


Produktmengen quantifiziert werden konnten. Da es sich kinetisch betrachtet bei NRPS-Modulen um zusammengesetzte Systeme mit sehr vielen Teilreaktionen handelt, können mit Standardmethoden keine echten  $K_m$ - und  $k_{cat}$ -Werte bestimmt werden. Die erhaltenen  $k_{obs}$ -Werte (obs = „observed“) beziehen sich auf die gegebenen Reaktionsbedingungen. Die entsprechenden Trp-Produkte wurden nur durch Massenspektroskopie nachgewiesen. Eine Analyse der Stereochemie sowie eine Quantifizierung der Produktmengen erfolgte nicht. Die Ergebnisse der HPLC-MS Untersuchungen sind in Abbildung 5-16 dargestellt.

TycB-Derivat	$k_{obs}$ (L-Phe) in $\text{min}^{-1}$	$k_{obs}$ (D-Phe) in $\text{min}^{-1}$
TycB <sub>2-3</sub> -AT.CATE (XI)	nicht bestimmt	1,1
TycB <sub>2-3</sub> -T.CATE (XII)	0,04	0,21
TycB <sub>3</sub> -CATE (XIII)	0,07	0,72
TycB <sub>3</sub> -ATE (XIV)	0,91	1,16

**Tabelle 5-4,  $k_{obs}$ -Werte der TycB-Derivate XI, XII, XIII und XIV für die Phe-Asn Dipeptidbildung:** Die Produktbildungsraten der TycB-Derivate XI, XII, XIII und XIV für die Dipeptide L/D-Phe-L-Asn wurden für das entwickelte *in vitro* System bestimmt. Hierzu wurde die Produktmenge, die bei der Reaktion der TycB-Derivate XI, XII, XIII und XIV mit TycC<sub>1</sub>-CAT/Te (XVI) entstanden war durch den Vergleich mit einem Peptidstandard per HPLC-MS quantifiziert. Als Substrate wurden L-Phe und D-Phe eingesetzt.

Für die HPLC-Assays wurde nur TycC<sub>1</sub>-CAT/Te (VI) als Akzeptorprotein eingesetzt. In einer Negativkontrolle ohne dieses Protein fand keine Produktbildung mehr statt. Die Produktbildung erfolgte also katalytisch. In Abbildung 5-16-a sind die Mengen an Phe-Asn miteinander verglichen, die mit den TycB-Derivaten XII, XIII und XIV und den Substraten L-Phe bzw. D-Phe erhalten wurden. Die errechneten Werte für  $k_{obs}$  sind in Tabelle 5-4 zusammengefasst. Die Daten, die für L-Trp erhalten wurden waren mit denen für L-Phe vergleichbar (Daten nicht gezeigt). Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass mit den beiden Proteinen TycB<sub>2-3</sub>-T.CATE (XII) und TycB<sub>3</sub>-CATE (XIII), die ihre natürlichen N-terminalen C-Domänen besitzen, mit L-Phe oder L-Trp als Substrat nur sehr kleine Mengen der Dipeptide Phe-Asn und Trp-Asn gebildet wurden. Im Gegensatz dazu wurde mit TycB<sub>3</sub>-ATE (XIV), dem diese N-terminale C-Domäne fehlt, ungefähr 15 mal mehr Produkt erhalten. Überraschenderweise wurde bei diesem Protein eine Mischung aus den beiden Diastereomeren L-Phe-L-Asn und D-Phe-L-Asn im Verhältnis von ca. 2:1 gefunden (vergleiche Abb. 5-16-b). Die Produktmengen, die mit den Enzymen XII und XIII gefunden wurden reichten für eine eindeutige Analyse der Stereochemie nicht aus. Generell ist zu sagen,



**Abbildung 5-16: Produktbildungsaktivitäten der TycB3-Derivate XI, XII, XIII und XIV analysiert durch HPLC-MS (detektierter Massenbereich: 100-600 Da)**

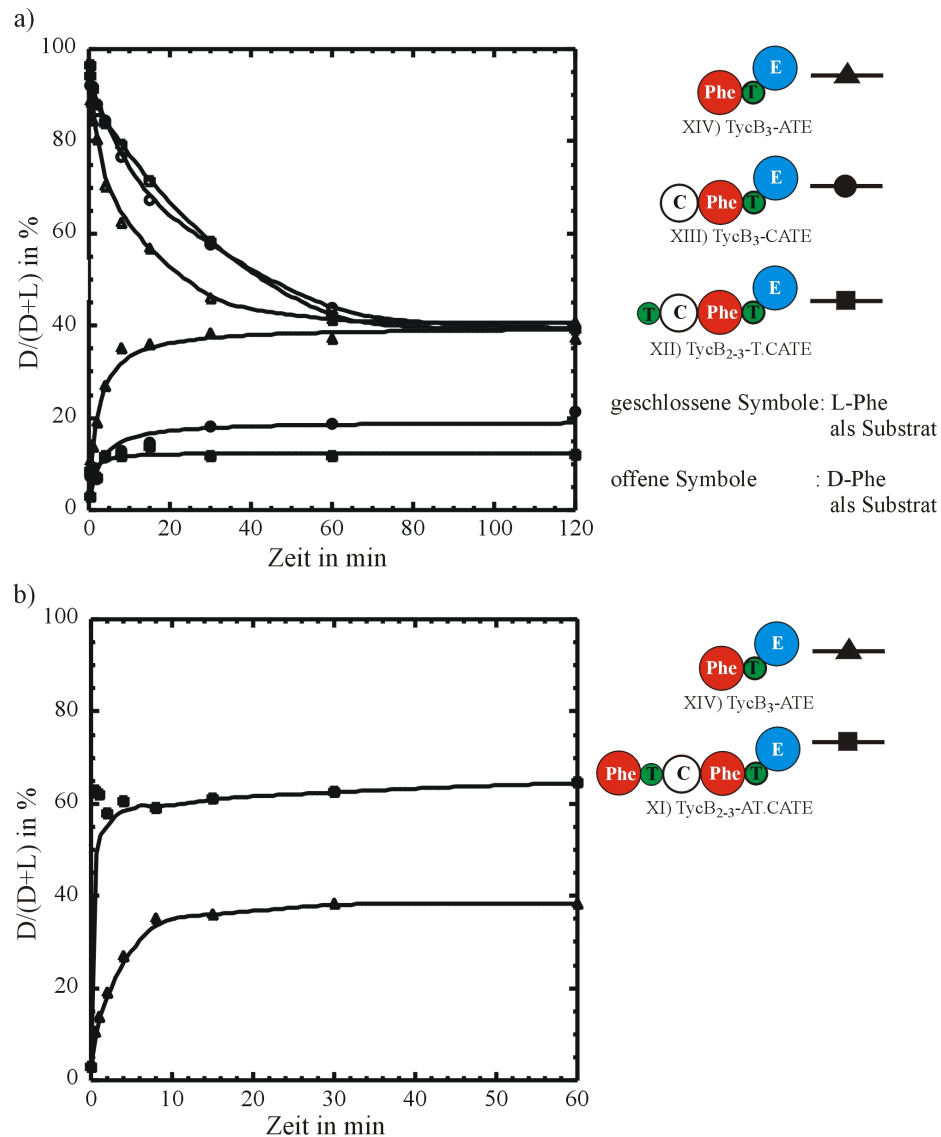
In allen Fällen wurde TycC<sub>1</sub>-CAT/Te (XVI) als Akzeptorenzym verwendet. Die fusionierte Te-Domäne spaltete die gebildeten Di- und Tripeptide von dem holo-PCP ab, so dass die Enzyme wieder für einen neuen Katalysezyklus zur Verfügung standen. (a) Graphischer Vergleich der Produktmengen, die in vergleichbaren Ansätzen von den Enzymen TycB<sub>2,3</sub>-T.CATE (XII; blau), TycB<sub>3</sub>-CATE (XIII; grün) und TycB<sub>3</sub>-ATE (XIV; rot) mit L-Phe (durchgezogene Linie) und mit D-Phe (gepunktete Linie) gebildet wurden. Gezeigt ist lediglich die Masse  $M+H^+$  (Phe-Asn) (280) im „Extract Ion Mode“. (b) Von TycB<sub>3</sub>-ATE (XIV) gebildete Dipeptide mit L-Phe (durchgezogene Linie) und mit D-Phe (gepunktete Linie) als Substrat. Die Produktsignale von Phe-Asn, die im „Full Scale Mode“ vergrößert dargestellt sind, wurden durch Extraktion der Masse 280 (Phe-Asn + H<sup>+</sup>) aus dem Gesamtspektrum erhalten (L-Phe: rot und durchgezogene Linie; D-Phe, grün und gepunktete Linie). Mit L-Phe als Substrataminosäure ist ein Gemisch aus den Diastereomeren L-Phe-L-Asn und D-Phe-L-Asn entstanden (Verhältnis ca. 2:1), während mit D-Phe ausschließlich D-Phe-L-Asn gebildet wurde. (c) Produkte, die von TycB<sub>2,3</sub>-AT.CATE (XI) als Initiationsenzym mit L- und D-Phe als Substraten gebildet wurden (L-Phe, durchgezogene Linie; D-Phe gepunktete Linie). Die darunter gezeigten Daten wurden durch die Extraktion der Massen  $M + H^+ = 280$  (Phe-Asn) und  $M + H^+ = 427$  (Phe-Phe-Asn) aus den Originaldaten erhalten (L-Phe: rot und durchgezogene Linie; D-Phe: grün und gepunktete Linie). Mit L-Phe als Substrat wurde ausschließlich L-Phe-D-Phe-L-Asn gebildet. Mit D-Phe hingegen entstand durch Mis-Initiation das verkürzte Dipeptid D-Phe-L-Asn, während als. Das gebildete Produkt mit der Masse 427 wurde nicht charakterisiert. Möglicherweise handelt es sich um D-Phe-D-Phe-L-Asn.

dass sich die Trennung dieser beiden Diastereomere als sehr schwierig erwies. Wurde hingegen D-Phe als Substrataminosäure eingesetzt, so wurde ausschließlich das erwartete Produkt D-Phe-L-Asn gebildet. Außerdem stieg die Produktbildungsrate mit D-Phe als Substrat in den Assays mit den eine N-terminale C-Domäne tragenden Enzymen XII und XIII um das zehnfache an (siehe Tabelle 5-4). Im Fall von TycB<sub>3</sub>-ATE (XIV), welches bereits mit L-Phe deutlich mehr Produkt synthetisiert hatte, war dieser Anstieg nur sehr klein (von 0,91 min<sup>-1</sup> auf 1,16 min<sup>-1</sup>).

TycB<sub>2-3</sub>-AT.CATE (XI) produzierte mit L-Phe als Substrat ausschließlich das erwartete Tripeptid L-Phe-D-Phe-L-Asn (siehe Abbildung 5-16-c). Die Stereochemie wurde mit Peptidstandards für L-Phe-L/D-Phe-L-Asn verifiziert. Auf eine Quantifizierung wurde jedoch verzichtet, da der zur Verfügung stehende Peptidstandard nur eine garantierte Reinheit von 70% besaß. Das entsprechende Tripeptid Trp-Trp-Asn konnte ebenfalls nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Mit D-Phe als Substrat wurde wie erwartet kein L-Phe-D-Phe-L-Asn Tripeptid gefunden (siehe Abbildung 5-16-c). Überraschend war aber, dass als Hauptprodukt das Dipeptid D-Phe-L-Asn ( $k_{\text{obs}} = 1,1 \text{ min}^{-1}$ ) mit einer vergleichbaren Geschwindigkeit zu dem einmodularen System XIV ( $k_{\text{obs}} = 1,16 \text{ min}^{-1}$ ) gebildet wurde. Als Nebenprodukt wurden sehr kleine Mengen eines Produktes mit der Masse 426 Da gefunden, wobei es sich sehr wahrscheinlich um D-Phe-D-Phe-L-Asn handelt, für das jedoch kein Standard verfügbar war. Zusammenfassend kann man feststellen, dass die Produktbildungsraten für das Dipeptid Phe-Asn mit D-Phe als Substrat für alle TycB-Derivate (XI, XII, XIII und XIV) in der gleichen Größenordnung lagen. Wurden jedoch die entsprechenden L-konfigurierten Substrate L-Phe oder L-Trp verwendet, so zeigten die Proteine mit N-terminaler C-Domäne XII und XIII um den Faktor zehn verringerte Produktbildungsraten. TycB<sub>2-3</sub>-AT.CATE (XI) produzierte hingegen die erwarteten Tripeptide L-Phe-D-Phe-L-Asn und Trp-Trp-Asn.

#### **5.4.5 Epimerisierungsaktivitäten der TycB-Derivate XI, XII, XIII und XIV**

Epimerisierungsdomänen katalysieren sowohl die L-nach-D als auch die D-nach-L Umwandlung von aminoacyl-S-Ppant oder peptidyl-S-Ppant Substraten. Nach einer gewissen Zeit bildet sich ein enzymabhängiges Gleichgewicht zwischen L- und D-Konfiguration aus. Bisher wurde nur die aminoacyl-E-Domäne von GrsA eingehend studiert [57, 103], jedoch keine peptidyl-E-Domäne. Das Ausmaß der Phe-S-Ppant Epimerisierung wurde in Abhängigkeit von der Zeit sowohl mit [<sup>14</sup>C]-L-Phe als auch mit [<sup>14</sup>C]-D-Phe als Substrat für die Enzyme TycB<sub>2-3</sub>-T.CATE (XII), TycB<sub>3</sub>-CATE (XIII) und TycB<sub>3</sub>-ATE (XIV) bestimmt (vergleiche Methoden 4.3.6). Die Ergebnisse sind in Abbildung 5-17-a gezeigt.



**Abbildung 5-17: Epimerisierungskinetiken der TycB-Derivate**

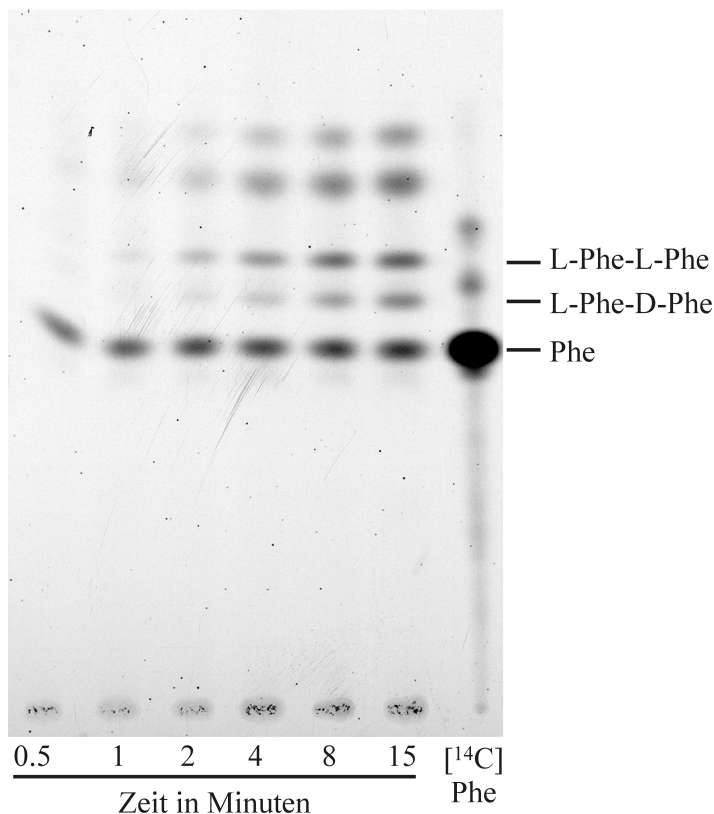
(a) L-zu-D und D-zu-L Epimerisierung in den Phe-S-Ppant Thioester-Komplexen von TycB<sub>2,3</sub>-T.CATE (XII) (Quadrate), TycB<sub>3</sub>-CATE (XIII) (Kreise) und TycB<sub>3</sub>-ATE (XIV) (Dreiecke). Offene Symbole repräsentieren [<sup>14</sup>C]-D-Phe als Substrat, geschlossene Symbole [<sup>14</sup>C]-L-Phe. Die holo-Enzyme wurden mit L- oder D-[<sup>14</sup>C]-Phe bei 37°C inkubiert. Zu definierten Zeitpunkten wurden Proben genommen. Nachdem die Reaktion schnell mit 10% TCA abgestoppt worden war, wurden die Aminosäuren alkalisch vom Enzymtemplat abgespalten, gereinigt und auf chirale DC-Platten aufgetragen. Nach dem Entwickeln der DCs mit Acetonitril/Wasser/Methanol [4:1:1 (v/v)] wurde die Verteilung der Radioaktivität mit einem zweidimensionalen Radioscanner quantifiziert. (b) Vergleich der L-zu-D Umwandlung in den Phe-Phe-S-Ppant Komplexen von TycB<sub>2,3</sub>-AT.CATE (XI) (Quadrate) mit der L-zu-D Epimerisierung im Phe-S-Ppant Komplex von TycB<sub>3</sub>-ATE (XIV) (Dreiecke, vergleiche a)). Die Inkubation und Aufarbeitung erfolgte wie in a) beschrieben. Die abgespaltenen Dipeptide wurden aber auf Silica<sub>60</sub> DC-Platten aufgetragen und mit dem Lösemittelgemisch Butanol/Wasser/Essigsäure/Essigsäureethylester [1:1:1:1 (v/v)] entwickelt.

Mit [ $^{14}\text{C}$ ]-L-Phe als Substrat erreichte TycB<sub>3</sub>-ATE (XIV) ein Gleichgewicht von ~40% D-Phe-S-Ppant nach ca. 10 Minuten, während die beiden Proteine mit N-terminaler C-Domäne XII und XIII dieses Gleichgewicht innerhalb des gemessenen Zeitraumes von zwei Stunden nicht erreichen konnten. Wurde hingegen [ $^{14}\text{C}$ ]-D-Phe als Substrataminosäure eingesetzt, benötigten alle drei Enzyme (XII, XIII und XIV) ungefähr eine Stunde um ein gemeinsames Gleichgewicht von ~40% D-Phe-S-Ppant einzustellen.

Für das dimodulare System XI wurde die Zeitabhängigkeit der peptidyl-S-Ppant Epimerisierungsreaktion nur mit [ $^{14}\text{C}$ ]-L-Phe als Substrat bestimmt, da nicht davon auszugehen war, dass die erste A-Domäne (TycB<sub>2</sub>-A) effizient D-Phe aktiviert (vergleiche Ergebnisse 5.4.2) und da anhand der HPLC-MS Untersuchungen mit D-Phe als Substrat erwartungsgemäß nur eine unzureichende Dipeptidbildung festgestellt worden war. Wie in Abbildung 5-17-b zu sehen, wurde ein Gleichgewicht von ~62% L-Phe-D-Phe-S-Ppant in weniger als 30 Sekunden, was dem ersten Messpunkt entsprach, erreicht.

#### **5.4.6 Epimerisierungsaktivität von TycB<sub>2,3</sub>-AT.CAT/E (XXV)**

Mit dem entwickelten *in vitro* System konnte gezeigt werden, dass eine peptidyl-E-Domäne prinzipiell dazu in der Lage ist, ein aminoacyl-S-Ppant Substrat zu epimerisieren, wenn auch mit verringerter Aktivität. Um zu untersuchen, ob eine aminoacyl-E-Domäne auch dazu in der Lage ist ein peptidyl-S-Ppant Substrat zu epimerisieren, wurde der für die E-Domäne kodierende Bereich in p[tycB<sub>2,3</sub>-AT.CATE] (XI) gegen den der E-Domäne von TycA ausgetauscht. Daraus resultierte nach der Expression und Aufreinigung das rekombinante Fusionsprotein TycB<sub>2,3</sub>-AT.CAT/E (XXV). Dieses Protein aktivierte Phe und Trp als Aminoacyladenylat. Eine Aminoacylierung mit [ $^{14}\text{C}$ ]-L-Phe erfolgte ebenfalls, so dass dieses Protein im Epimerisierungsassay getestet werden konnte. Das Ergebnis ist in Abbildung 5-18 gezeigt. Wie man erkennt, konnten die Dipeptide L-Phe-L-Phe und L-Phe-D-Phe vom Enzymtemplat abgespalten werden. Die Intensitäten der Signale für L-Phe-D-Phe sind aber deutlich schwächer als für L-Phe-L-Phe. Die Ergebnisse des Epimerisierungsassays von TycB<sub>2,3</sub>-AT.CATE (XI), welches eine peptidyl-E-Domäne besitzt, zeigten hingegen ein Verhältnis von L-Phe-L-Phe zu L-Phe-D-Phe von ca. 1:2. Auch in diesem Fall scheint es also so zu sein, dass eine Epimerisierung des unnatürlichen Substrates zwar prinzipiell möglich ist, allerdings nur mit verminderter Effizienz, wie dies auch schon für die peptidyl-E-Domäne von TycB<sub>3</sub> bei der Epimerisierung eines unnatürlichen aminoacyl-S-Ppant Substrates beschrieben wurde (vergleiche Ergebnisse 5.4.5).



**Abbildung 5-18: Autoradiographie der DC-Analyse des Epimerisierungsassays von TycB<sub>2,3</sub>-AT.CAT/E (XXV) mit [<sup>14</sup>C]-L-Phe als Substrat**

Die Zahlen unterhalb der Autoradiographie geben die Reaktionszeiten an. In der rechten Spur wurde [<sup>14</sup>C]-Phe als Standard aufgetragen, welches als Substrat eingesetzt worden war. Die Stereochemie der Produkte wurde anhand von Standards überprüft. Man erkennt, dass L-Phe-D-Phe gebildet wurde. Die Intensität der Signale für L-Phe-D-Phe sind aber deutlich schwächer als für L-Phe-L-Phe.

## 5.5 Elongationsversuche und Protein-Protein-Erkennung im Tyrocidin-Biosynthesystem über die Epimerisierungsdomänen

Die in dieser Arbeit konstruierten E-Domänen-Fusionsproteine sollten abschließend auf ihre Elongationsfähigkeit mit TycB<sub>1</sub>-CAT (XXVI) und TycB<sub>1</sub>-CAT/Te (XXVII) sowie mit TycC<sub>1</sub>-CAT/Te (XVI) getestet werden. Hierzu wurden jeweils die entsprechenden Substrataminosäuren eingesetzt. Die Assays wurden durchgeführt wie für den Produktbildungsassay des TycB<sub>3</sub> *in vitro* Systems (vergleiche Methoden 4.3.4) bzw. den DKP-Assay (vergleiche Methoden 4.3.5) beschrieben. Die qualitativen Ergebnisse sind in Tabelle 5-5 übersichtlich dargestellt. Eine Quantifizierung der Produktbildungsraten wurde nicht durchgeführt.

Donorprotein	Akzeptorprotein	Donor-Substrat	Produkt
TycA-ATE (V)	TycB <sub>1</sub> -CAT (XXVI)	L-Phe	DKP
	TycC <sub>1</sub> -CAT/Te (XVI)	L-Phe	n.d.
TycA-AT-TycB <sub>3</sub> -E (XVII)	TycB <sub>1</sub> -CAT (XXVI)	L-Phe	DKP
	TycC <sub>1</sub> -CAT/Te (XVI)	L-Phe	L/D-Phe-Asn
TycB <sub>3</sub> -ATE (XIV)	TycB <sub>1</sub> -CAT (XXVI)	L-Phe	n.d.
	TycC <sub>1</sub> -CAT/Te (XVI)	L-Phe	L/D-Phe-Asn
TycB <sub>3</sub> -AT/E (IIb)	TycB <sub>1</sub> -CAT (XXVI)	L-Phe	DKP
	TycC <sub>1</sub> -CAT/Te (XVI)	L-Phe	n.d.
TycB <sub>2,3</sub> -AT.CATE (XI)	TycB <sub>1</sub> -CAT/Te (XXVII)	L-Phe	n.d.
	TycC <sub>1</sub> -CAT/Te (XVI)	L-Phe	L-Phe-D-Phe-L-Asn
TycB <sub>2,3</sub> -AT.CAT/E (XXV)	TycB <sub>1</sub> -CAT/Te (XXVII)	L-Phe	DKP
	TycC <sub>1</sub> -CAT/Te (XVI)	L-Phe	n.d.
TycB <sub>2</sub> -A/TE	TycB <sub>1</sub> -CAT (XXVI)	L-Trp	Trp-Pro-Diketopiperazin
	TycB <sub>1</sub> -CAT/Te (XXVII)	L-Trp	Trp-Pro-Diketopiperazin
TycB <sub>3</sub> -A/TE (IIa)	TycB <sub>1</sub> -CAT (XXVI)	L-Phe	DKP
	TycB <sub>1</sub> -CAT/Te (XXVII)	L-Phe	DKP
TycC <sub>4</sub> -A/TE (IIIa)	TycB <sub>1</sub> -CAT (XXVI)	L-Val	n.d.
	TycB <sub>1</sub> -CAT/Te (XXVII)	L-Val	n.d.
BacA <sub>1</sub> -A/TE (IVa)	TycB <sub>1</sub> -CAT (XXVI)	L-Ile	n.d.
	TycB <sub>1</sub> -CAT/Te (XXVII)	L-Ile	n.d.

**Tabelle 5-5 Produktbildung verschiedener Donorproteine mit TycB<sub>1</sub>-CAT (XXVI), TycB<sub>1</sub>-CAT/Te (XXVII) und TycC<sub>1</sub>-CAT/Te (XVI):** Als Substrate für die Akzeptorproteine wurden entsprechend der Aktivität ihrer A-Domänen L-Pro oder L-Asn verwendet. Wenn bei den Produkten eine Angabe ihrer Stereochemie fehlt, so wurde diese aufgrund fehlender Peptidstandards nicht identifiziert. Die Abkürzung „n.d.“ (nicht detektiert) bedeutet, dass kein Produkt detektiert werden konnte.

Das Enzym V katalysierte zwar die Bildung von DKP, jedoch nicht die von Phe-Asn, während Enzym XIV sich umgekehrt verhielt (Phe-Asn wurde gebildet, aber kein DKP). Offenbar erkennen diese beiden Enzyme also selektiv ihre natürlichen Reaktionspartner TycB<sub>1</sub> bzw. TycC<sub>1</sub>. Das Fusionsprotein IIb, welches die E-Domäne von TycA trug, kommunizierte mit XXVI, aber nicht mehr mit XVI. Das entsprechende TycA Fusionsprotein XVII, welches die E-Domäne von TycB<sub>3</sub> besaß, verhielt sich allerdings nicht wie erwartet. Es konnte zwar eine

Kommunikation mit TycC<sub>1</sub> nachgewiesen werden, die mit TycA-ATE (V) nicht beobachtet wurde, die Kommunikation mit TycB<sub>1</sub> war jedoch nach wie vor gegeben und es wurde DKP gebildet. Im Fall der beiden dimodularen Donorsysteme XI und XXV wurde TycB<sub>1</sub>-CAT/Te (XXVII), welches C-terminal die Te-Domäne des Terminationsmoduls (TycC<sub>6</sub>) der Tyrocidin-Synthetase TycC trug, verwendet, da eine unkatalysierte Abspaltung ähnlich dem DKP aufgrund der geschützten Aminogruppe (Peptidbindung) des zweiten Phenylalanins nicht zu erwarten war. Der Assay wurde zusätzlich mit L-Abu (L-4-Aminobutyrat) als Substratanalogon für L-Pro durchgeführt, da dieses Fusionsprotein die Abspaltung von linearem D-Phe-L-Pro nicht katalysiert wohl aber die von D-Phe-L-Abu [91]. Das Dimodul XI kommunizierte nur mit seinem natürlichen Akzeptorenzym XVI. Es konnte ausschließlich das erwartete Tripeptid L-Phe-D-Phe-L-Asn nachgewiesen werden. Das entsprechende Fusionsprotein XXV, welches die E-Domäne von TycA enthielt, katalysierte wie erwartet nicht mehr die Bildung dieses Tripeptides mit XVI als Akzeptorenzym. Erstaunlicherweise wurden mit XXVII als Akzeptorenzym aber die verkürzten Produkte DKP (L-Pro Akzeptorsubstrat) und lineares D-Phe-L-Abu (Akzeptorsubstrat L-Abu) gebildet. Es konnten hingegen keine Tripeptide nachgewiesen werden, wie es eigentlich zu erwarten gewesen wäre. Im Falle der Fusionsproteine Ia, IIa, IIIa und IVa wurde ebenfalls als Akzeptorprotein XXVII mit der fusionierten Te-Domäne verwendet, da nicht klar war, ob Val-Pro-Diketopiperazin bzw. Ile-Pro-Diketopiperazin durch eine nicht-katalysierte Abspaltung entstehen können. Um mögliche Probleme bei der Katalyse der Produktabspaltung durch die Te-Domäne zu minimieren, wurden auch diese Assays zusätzlich mit L-Abu als Akzeptorsubstrat durchgeführt. Die Enzyme Ia und IIa waren ebenfalls dazu in der Lage, Trp bzw. D-Phe auf XXVI zu transferieren, was in der Bildung von Trp-L-Pro-Diketopiperazin bzw. von DKP resultierte. Die entsprechenden Enzyme IIIa und IVa katalysierten jedoch keine Produktbildung mit XXVII und L-Pro als Akzeptorsubstrat.



## 6 Diskussion

### 6.1 Motivation für diese Arbeit

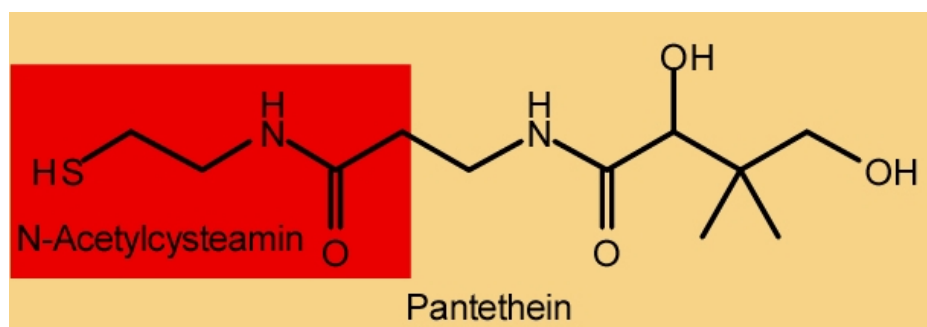
Viele nichtribosomal synthetisierte Peptide weisen interessante pharmakologische Aktivitäten auf. Dabei spielen D-Aminosäuren für die biologische Wirksamkeit der Substanzen offenbar eine wichtige Rolle. Wahrscheinlich verlangsamten sie unter anderem den Abbau durch Proteasen [1]. Es wird auch vermutet, dass erst durch die Verwendung von D-Aminosäuren bestimmte Konformationen entstehen, die die eigentliche Bioaktivität besitzen [162]. Aber trotz ihrer Bedeutung für die Bioaktivität und ihres damit verbundenen Potentials für kombinatorische Ansätze waren E-Domänen, die zu den optionalen Domänen gehören, bisher kaum charakterisiert. Es war wenig bekannt über die Substrattoleranz von E-Domänen. Lediglich für die E-Domäne von GrsA-ATE (VI) wurde beschrieben, dass L-Ala-S-Ppant epimerisiert wird [104]. Hierbei wurde ausgenutzt, dass die Phosphopantetheinyltransferase Sfp auch dazu in der Lage ist die posttranslationale Modifikation von apo-PCPs zu holo-PCPs mit Coenzym A zu katalysieren, welches bereits aminoacyliert ist. Außerdem werden in der Literatur zwei Typen von Epimerisierungsdomänen diskutiert. E-Domänen von Initiationsmodulen epimerisieren aminoacyl-S-Ppant Substrate [100], während E-Domänen von Elongationsmodulen peptidyl-S-Ppant Substrate epimerisieren, das heißt, im letzteren Fall findet zunächst die Kondensation mit dem „upstream“ Substrat statt und danach erst die Epimerisierung. Ob es tatsächlich einen funktionellen Unterschied dieser zwei E-Domänen-Typen gibt oder ob der Unterschied durch ihre Einbettung in unterschiedliche enzymatische Umgebungen und der damit verbundenen Wechselwirkung mit anderen Domänen bedingt ist, sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden. Über die Wechselwirkung von NRPS-Domänen untereinander war generell nur wenig bekannt.

Außerdem zielten die Bestrebungen der letzten Jahre unter anderem auf die gezielte Entwicklung von NRPS-Templaten zur biologischen Synthese neuer Produkte mit veränderten Eigenschaften [89, 90, 163, 164]. Insbesondere E-Domänen bakterieller Operons sind häufig am C-Terminus von Peptidsynthetasen zu finden. Es gab erste Hinweise, dass diese C-terminalen E-Domänen an der Protein-Protein Erkennung der nachfolgenden Synthetase beteiligt sind [52, 57], was sie für zukünftige kombinatorische Ansätze interessant macht. In dieser Arbeit wurde versucht, E-Domänen systematisch zu charakterisieren sowie ihr Zusammenspiel in NRPS mit anderen Domänen zu beleuchten.

## 6.2 Substratspezifität von E-Domänen

### 6.2.1 Externe Variation der Substrate

Eine wichtige Fragestellung dieser Arbeit war, ob E-Domänen aus NRPS eine Substratspezifität besitzen, beziehungsweise, wie breit ihre Substrattoleranz ist. Epimerisierungsdomänen katalysieren die Epimerisierung von aminoacyl-S-Ppant oder peptidyl-S-Ppant Substraten [100, 101]. Die große Schwierigkeit bei der Untersuchung der Spezifität von E-Domänen bestand darin, dass sie stets Teil eines Moduls sind, in welchem die zugehörige A-Domäne die Substratspezifität festlegt. Nur dieses Substrat wird effizient aktiviert, auf das zugehörige PCP transferiert und von der zugehörigen E-Domäne epimerisiert. Von Ketosynthasedomänen aus PKS-Systemen, welche acyl-S-Ppant Substrate umsetzen, als auch für die C-Domäne eines NRPS-Systems



**Abbildung 6-1: Pantethein und N-Acetylcysteamin**

Mit Aminosäuren (aminoacyl-SNAC) oder Peptiden (peptidyl-SNAC) derivatisiertes N-Acetylcysteamin (rot unterlegt) wurde als Substrat für E-Domänen getestet, jedoch von diesen nicht epimerisiert. Verlängerte Pantetheinderivate (beige unterlegt) hingegen zeigten Epimerisierungsaktivität [161].

sowie für Te-Domänen war bekannt, dass *in trans* zugegebene verkürzte Substratanaloga, sogenannte SNACs, mit großer Effizienz umgesetzt werden [92, 159]. SNACs entstehen durch die Kopplung der Substrataminosäuren an N-Acetylcysteamin (vergleiche Abbildung 6-1). Die synthetischen Thioester imitieren das 3'-Ende eines aminoacylierten Kofaktors Ppant. Durch die Verwendung von SNACs gelang es so die Selektivität der A-Domänen zu umgehen. Für die Te-Domäne aus Tyrocidin konnten auf diese Weise sogar die Spezifitäten der kompletten Tyrocidin Synthetasen TycA, TycB und TycC umgangen werden, was eingehende Untersuchungen der Te-Domänen Spezifität erlaubte [92-94].

Daher wurde zunächst untersucht, ob solche Substrate auch in Epimerisierungsassays mit E-Domänen verwendbar sind. Neben der schnellen Variation der Substrate durch chemische Synthese hätte diese Methode außerdem den Vorteil gehabt, dass sie kinetische Untersuchungen erheblich erleichtert hätte. Da es sich bei NRPS-Modulen um komplexe Systeme mit vielen gekoppelten Reaktionen handelt, sind Standardmethoden hier nicht anwendbar. Eine einzelne Domäne hingegen ließe sich leicht kinetisch charakterisieren.

Getestet wurden apo- und holo-Module (TycA-ATE (V) und TycB<sub>3</sub>-ATE (XIV)), sowie eine aminoacyl- und eine peptidyl-E-Domäne als eigenständige Einheiten (TycA-E (XXVIII) und TycB<sub>3</sub>-E (XXIX)) mit diversen SNAC-Substraten. Es stellte sich jedoch schnell heraus, dass SNAC-Derivate nicht als E-Domänensubstrate geeignet sind.

Neueste Ergebnisse zeigen, dass aminoacylierte-Pantetheinderivate (siehe Abbildung 6-1) hingegen als Substratanaloga akzeptiert werden [161]. Diese sind länger als die SNACs und imitieren den gesamten aminoacylierten Ppant-Kofaktor der PCPs, was für die Interaktion mit der E-Domäne offenbar notwendig ist. Zusammen mit den erhaltenen Ergebnissen für die PCP<sup>E</sup>-E-Domänen-Interaktion und den Einfluss der Mutationen im CoreT von GrsA auf die Epimerisierungsaktivität lässt sich vermuten, dass die E-Domäne sowohl den 4'-Ppant-Kofaktor als Ganzes erkennt und bindet als auch mit der Oberfläche des PCP<sup>E</sup> interagiert.

### **6.2.2 Fusionsproteine – Änderung der Spezifität durch Austausch der A-Domänen**

Da SNACs nicht geeignet waren die Spezifität von E-Domänen zu testen wurde nach Alternativen gesucht. A-Domänen weisen generell Seitenspezifitäten auf, das heißt, es werden auch Substrate mit ähnlichen Eigenschaften wie das eigentliche Substrat adenyliert und als Thioester gebunden. Allerdings ist die Aminoacylierungsreaktion in diesen Fällen ineffizient und langsam. Außerdem war davon auszugehen, dass solche Substrate auch von den zugehörigen E-Domänen epimerisiert werden. Zu Beginn der Arbeit wurde der „nichtribosomale Code“ publiziert, der zehn Aminosäuren umfasst, die die Spezifität der Aminosäurebindungstaschen von A-Domänen determinieren [63]. Eine weitere Möglichkeit wäre somit die Veränderung der A-Domänenselektivität durch gezielte Mutationen in der Bindungstasche der A-Domäne eines A-PCP-E Moduls gewesen. Da bis heute aber hierzu kaum biochemische Daten vorliegen, wurde eine weitere Möglichkeit favorisiert. Dies ist der Austausch der kompletten A-Domäne gegen eine andere mit veränderter Selektivität. Die Domänengrenzen in NRPS-Multienzymen, insbesondere die der PCPs mit ihren benachbarten Domänen, wurden bereits recht genau charakterisiert [164]. Durch Fusionen zwischen den A- und PCP Domänen konnten auch bereits hybride Peptidsynthetasen erhalten werden, die die

gewünschten Produkte synthetisierten [90], die allerdings keine D-Aminosäuren enthielten. Hingegen war nur eine Fusion zwischen einem PCP und einer E-Domäne bekannt, wobei die E-Domäne aber inaktiv war. Die Autoren mutmaßten, dass dies an der N-Methylierungsdomäne in der hybriden Peptidsynthetase läge, eine Kombination die man so in der Natur nicht findet [165].

Um die geeignetste Fusionsstelle für E-Domänen-Fusionsproteine zu finden und um die Wechselwirkung von E-Domänen mit ihrer enzymatischen Umgebung zu studieren, wurden auf genetischer Ebene zwei Klassen von Fusionsproteinen konstruiert: A/PCP-E und A-PCP/E (vergleiche Abbildung 5-1-B).

Zunächst wurde die Kommunikation zwischen A-Domänen und PCPs durch Aminoacylierungskinetiken untersucht. Der Einfluss einer Fusion zwischen A-Domäne und PCP war bisher noch nicht im Detail untersucht worden. Wohl aber war bekannt, dass A-Domänen PCPs *in trans* aminoacylieren können, wenn auch mit herabgesetzter Aktivität [49, 166]. Außerdem wurden Hybride mit der Fusionsstelle zwischen A-Domäne und PCP aminoacyliert [90]. Das hier konstruierte Set aus acht Fusionsproteinen der Typen A/PCP-E (Ia, IIa, IIIa und IVa) und A-PCP/E (Ib, IIb, IIIb und IVb) bot die Möglichkeit, jeweils die natürliche A-PCP-Interaktion mit der nicht-natürlichen zu vergleichen. Es stellte sich heraus, dass die Fusionsproteine mit der natürlichen A-PCP-Interaktion (A-PCP/E; vergleiche Abbildung 5-1-B Serie b) schneller aminoacyliert wurden als die vergleichbaren des Typs A/PCP-E (vergleiche Abbildung 5-1-B, Serie a) mit der unnatürlichen Interaktion. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass im Laufe der Evolution offenbar eine Optimierung der Kommunikation zwischen A-Domäne und zugehörigem PCP stattgefunden hat. Gestärkt wird dieser Befund durch zwei weitere Beobachtungen. Zum einen waren die Proteine Ia und IIa, beide besitzen eine unnatürliche Fusionsstelle zwischen A-Domäne und PCP, schlecht löslich und zeigten nur eine Restaktivität wenn die Expression bei 30°C durchgeführt worden war. Erst durch die Expression bei niedrigeren Temperaturen konnte das Problem gelöst werden. Zum anderen wurden einige weitere Fusionsproteine des Typs A/PCP-E (XVIII, XIX und XX), obwohl sie gute Adenylierungseigenschaften besaßen, überhaupt nicht aminoacyliert. Wahrscheinlich ist dies auf eine gestörte Kommunikation zwischen A-Domäne und PCP zurückzuführen, obwohl nicht ausgeschlossen werden kann, dass - wie auch immer - die E-Domäne die Aminoacylierung der jeweiligen PCPs verhindert. Die Fusionsproteine Ia, Ib, IIa, IIb, IIIa, IIIb, IVa und IVb wurden aber alle hinreichend gut aminoacyliert um sie in den Epimerisierungsassays einsetzen zu können.

## 6.3 Der Einfluss der PCPs auf die Epimerisierung – PCP<sup>E</sup>s versus PCP<sup>C</sup>s

### 6.3.1 Selektivität von E-Domänen und ihre Kommunikation mit dem PCP<sup>E</sup>

Die acht Fusionsproteine Ia, Ib, IIa, IIb, IIIa, IIIb, IVa und IVb wurden unter vergleichbaren Bedingungen im Epimerisierungsassay eingesetzt, um zu untersuchen, ob und wie effizient die entsprechenden Substrate epimerisiert werden. Es zeigte sich, dass die E-Domäne von TycA, welche im natürlichen System L-Phe epimerisiert, sehr wohl dazu in der Lage ist, die alternativen Substrate L-Trp-S-Ppant, L-Val-S-Ppant und L-Ile-S-Ppant zu epimerisieren, wenn auch mit verminderter Effizienz. Die Fusionsproteine der Serie a (Ia, IIa, IIIa und IVa) zeigten alle Epimerisierungsaktivität. Überraschend war aber, dass die gleiche E-Domäne in den Hybriden Ib, IIIb und IVb inaktiv war, während sie in IIb eine Aktivität zeigte. Der Unterschied zwischen diesen Fusionsproteinen ist, dass das letztgenannte ein PCP<sup>E</sup> von TycB<sub>3</sub> enthält, während die anderen drei PCP<sup>C</sup>s aus TycB<sub>2</sub>, TycC<sub>4</sub> und BacA<sub>1</sub> enthalten. Es besteht also offenbar ein Zusammenhang zwischen dem Ursprung des PCPs und der Epimerisierungsaktivität. E-Domänen scheinen nur in Verbindung mit einem PCP aktiv zu sein, welches natürlicherweise mit einer E-Domäne interagiert. Ein Einfluss der Aminoacylierungseffizienz auf die mangelnde Epimerisierungsaktivität kann hingegen ausgeschlossen werden, da die Fusionsproteine Ib, IIIb und IVb allesamt effizienter aminoacyliert worden waren als die vergleichbaren Proteine Ia, IIIa und IVa, welche epimerisierungsaktiv waren. Ebenso ist auszuschließen, dass dieser Effekt auf Spezifitätsprobleme der E-Domäne von TycA mit den unnatürlichen Substraten zurückzuführen ist. Zum einen konnte mit den Fusionsproteinen Ia, IIa, IIIa und IVa bereits gezeigt werden, dass sie diese veränderten Substrate prinzipiell epimerisieren kann, zum anderen wurde das gleiche Ergebnis für Ib erhalten, wenn L-Phe-S-Ppant das Substrat der E-Domäne war, was ihrem natürlichen Substrat entspricht.

Vor einiger Zeit war eine phylogenetische Studie veröffentlicht worden, die ein „clustern“ von solchen PCPs zeigte, die jeweils mit den gleichen Domänentypen verbunden waren [160]. Durch Sequenzvergleiche konnte nun in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die damals beschriebenen PCP-Typen (PCP<sup>C</sup> und PCP<sup>E</sup>) einige signifikante Unterschiede in ihren Primärsequenzen aufweisen. Hervorzuheben ist hierbei der Austausch von zwei Aminosäuren in dem hochkonservierten CoreT der PCP<sup>E</sup>s verglichen mit den PCP<sup>C</sup>s, dem wichtigen Bereich, der die Kofaktorbindestelle, das invariante Serin, enthält. PCP<sup>C</sup>s zeigen die Core-Sequenz [GGHSL], während die Konsensus-Sequenz bei PCP<sup>E</sup>s [GGDS] lautet (die beiden

Aminosäurevariationen sind jeweils unterstrichen). Außerdem konnten durch diese Sequenzvergleiche einige weitere signifikante Unterschiede an den Positionen 50, 58, 64, 67 und 70 identifiziert werden. N-terminal des CoreT wurden hingegen überhaupt keine augenscheinlichen Variationen gefunden. Interessanterweise lokalisieren alle genannten Variationen innerhalb der  $\alpha$ -Helices zwei und drei (vergleiche Abbildung 5-8), wenn man die NMR-Struktur von TycC<sub>1</sub>-PCP (PCP<sup>C</sup>-Typ) [50] zu Grunde legt. Mit großer Wahrscheinlichkeit dürfte es sich bei diesen beiden  $\alpha$ -Helices um die Interaktionsstelle zwischen PCP<sup>E</sup>s und E-Domänen handeln. Es könnte sich um eine universelle Kontaktstelle von PCPs mit anderen Domänen handeln, da genau dieser Bereich auch für die Interaktion der PCPs sowohl mit der Te-Domäne [167] als auch mit Phosphopantetheinyltransferasen [168, 169] verantwortlich zu sein scheint.

Kürzlich wurde von *Schauwecker et al.* berichtet, dass die E-Domäne der Actinomycin Synthetase in dem Fusionsprotein „AcmTmVe“ keine Aktivität zeigte, obwohl sie keine Mutationen enthielt und, wieder zurückgebracht in das ursprüngliche Protein, epimerisierte [165]. Als möglicher Grund wurde angeführt, dass die Kombination einer E-Domäne mit einer M-Domäne in ein und demselben Modul, wie es im genannten Fusionsprotein „AcmTmVe“ der Fall ist, aus natürlichen Systemen nicht bekannt ist. Obwohl eine Inkompatibilität von E-Domänen mit einer M-Domäne anhand der Ergebnisse dieser Arbeit nicht ausgeschlossen werden kann, so scheint es sicher, dass die beschriebene Inaktivität primär auf die mangelnde Kommunikation zwischen dem PCP<sup>C</sup> und der E-Domäne in „AcmTmVe“ zurückzuführen ist.

### **6.3.2 Die Auswirkung von Mutationen im PCP auf die Epimerisierungs- und Produktbildungsaktivität**

Da sich bei der biochemischen Charakterisierung der Fusionsproteine herausgestellt hatte, dass PCP<sup>E</sup>s für eine Aktivität der E-Domäne notwendig sind und anhand der Sequenzvergleiche einige hochkonservierte Variationen zwischen PCP<sup>E</sup>s und PCP<sup>C</sup>s identifiziert werden konnten, sollte versucht werden, die Bedeutung einiger dieser Aminosäurereste für eine funktionale Interaktion der PCPs mit E-Domänen zu untersuchen. Besonders auffällig war die strikte Variation der beiden CoreT-Sequenzmotive. Da dieser Bereich das invariante Serin enthält, welches den Kofaktor 4'-Ppant bindet, wurde der Einfluss der Aminosäurevariationen im CoreT auf die Epimerisierungsreaktion anhand von GrsA-ATE (VI) untersucht. GrsA-ATE (VI) und TycA-ATE (V) stammen beide aus *Bacillus brevis* und weisen untereinander eine hohe Homologie auf. Sie können sich im DKP-Assay

mit TycB<sub>1</sub>-CAT (XXVI) auch gegenseitig ersetzen [52]. Der Grund für die Wahl von GrsA-ATE (VI) anstelle von TycA-ATE (V) für diese Untersuchungen lag darin begründet, dass das erstgenannte Protein sehr gut charakterisiert ist und als Modellsystem zur Charakterisierung von NRPS, insbesondere auch der Epimerisierungsreaktion, eine lange Tradition besitzt [52, 57, 65, 100, 103, 104, 161].

Es wurden folgende Mutanten erzeugt: GrsA-ASI (VII), GrsA-HSI (VIII), GrsA-HSL (IX) und GrsA-DSL (X). Zur Charakterisierung wichtiger Reste sind in der Literatur oft Alanin-Mutationen beschrieben. Der Vorteil dieses Verfahrens ist, dass Alanin eine kleine Aminosäure ist und deshalb kaum Auswirkungen der Mutationen auf die Tertiärstruktur zu erwarten sind. Diese Methode ist bei Mutante VII verwirklicht. Mutante VIII enthält an gleicher Stelle ein Histidin, was man an dieser Position im CoreT von PCP<sup>C</sup>s findet. Mutante IX ist eine Doppelmutante, die das komplette CoreT eines PCP<sup>C</sup>s imitiert. Bei Mutante X wurde die Variation des Isoleucins untersucht. Aufgrund der Ähnlichkeit von Leucin und Isoleucin wurde hier auf eine Mutation zu Alanin verzichtet. Die Mutanten wurden sowohl im Epimerierungsassay als auch im DKP-Produktbildungsassay untersucht und mit VI verglichen. Interessanterweise scheint das Asp im CoreT von PCP<sup>E</sup>s, welches dem invarianten Serin unmittelbar vorausgeht, einen großen Einfluss auf die Epimerisierungsaktivität zu besitzen. Der Austausch von Ile gegen Leu hingegen zeigte keinen signifikanten Einfluss, was aufgrund der ähnlichen Größe und chemischen Eigenschaften von Leucin und Isoleucin auch nicht unbedingt zu erwarten war, obwohl hierbei zu beachten ist, dass die Doppelmutante IX am stärksten von allen Mutanten in der Epimerisierungsaktivität beeinträchtigt war.

Sowohl VIII als auch IX zeigten eine stark verlangsamte Epimerisierungsreaktion und verringerte Produktbildungsraten im DKP-Assay mit L-Phe als Substrat, während VII nur im DKP-Assay beeinträchtigt war. Mit D-Phe als Substrat hingegen wurden für alle GrsA-Mutanten zum Wildtyp vergleichbare Produktbildungsraten im DKP-Assay erhalten. Dies deutet darauf hin, dass die Interaktion zwischen dem „donor“-PCP und der C-Domäne durch die CoreT-Mutationen nicht beeinflusst wurde und die verringerte Produktbildungsaktivität alleine auf eine Verlangsamung der Epimerisierung zurückzuführen ist. Auffällig ist die Diskrepanz zwischen Epimerierungsassay und DKP-Assay im Fall der Mutante VII. Hier muss man aber beachten, dass die kürzeste im Epimerierungsassay gemessene Zeit dreißig Sekunden betrug, während das L/D-Gleichgewicht im Wildtyp bereits nach weniger als zwei Sekunden eingestellt ist [103]. Es ist demnach zu erwarten, dass man für Mutante VII ebenfalls eine verminderte Epimerisierungsaktivität finden würde, wenn man das System mit

Rapid-Quench Techniken charakterisieren würde, welche es erlauben, Proben in extrem kurzen Zeiten zu mischen und abzustoppen. Die gleiche Technik müsste auch zur genaueren Charakterisierung der Epimerisierungskinetik von X Verwendung finden, da hier das L/D-Gleichgewicht ebenfalls in weniger als dreißig Sekunden erreicht wurde.

Zusammenfassend ist es jedoch offensichtlich, dass das CoreT von PCPs die Epimerisierungsaktivität von „downstream“ direkt anschließenden E-Domänen beeinflusst. Die wahrscheinlichste Erklärung für diesen Effekt ist, dass die optimale Positionierung des aminoacyl-S-Ppant Substrates durch die Mutation des Asp im CoreT zu Ala oder His beeinflusst wird. Es ist denkbar, dass einer oder mehrere Reste der E-Domäne mit diesem Asp interagieren und dadurch eine optimale Positionierung der E-Domäne relativ zum Substrat erreicht wird. Genauso kann es aber auch sein, dass das Asp den Ppant-Kofaktor in eine Position bringt, in der er von der E-Domäne effizient gebunden werden kann.

Da der inaktivierende Einfluss eines imitierten CoreT's von PCP<sup>C</sup>s in PCP<sup>E</sup>s auf die Epimerisierungsreaktion nun experimentell belegt war, wurde daraufhin versucht, ein inaktives PCP<sup>C</sup>-enthaltendes Fusionsprotein durch Punktmutationen zu aktivieren. Gewählt wurde TycB<sub>2</sub>-AT/E (Ib), welches neben L-Trp auch L-Phe aktivieren kann, was dem natürlichen Substrat der fusionierten E-Domäne von TycA entspricht. Durch die Verwendung von L-Phe in den Epimerisierungsassays mit den PCP-Mutanten von Ib wurde sichergestellt, dass kein ungewünschter durch ein nicht-natürliches E-Domänensubstrat erzeugter Effekt einen möglichen Einfluss der PCP-Mutationen auf die Epimerisierungsreaktion überlagert. Das CoreT wurde dabei generell bei allen Mutanten von Ib dem CoreT eines PCP<sup>E</sup>'s nachempfunden. Doch trotz Einführung weiterer Mutationen „downstream“ des CoreT gelang es nicht, eine epimerisierungsaktive Mutante zu erzeugen. Alle in Frage kommenden Reste, die durch die Sequenzvergleiche identifiziert worden waren, wurden aber nicht mutiert, da bei den vorliegenden Mutanten festgestellt wurde, dass die Löslichkeit der Proteine mit zunehmender Anzahl an Mutationen abnahm. Die Ergebnisse zeigen aber, dass ein PCP<sup>C</sup> nicht durch ein oder zwei Punktmutationen in ein PCP<sup>E</sup> umgewandelt werden kann. Vielmehr ist davon auszugehen, dass das Zusammenspiel dieser Sequenzunterschiede erst zu einer Aktivität führt. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass der Austausch eines 14 Aminosäurereste umfassenden Bereiches eines PCP's, der die  $\alpha$ -Helix 2 beinhaltet, gegen den entsprechenden Bereich eines ACP's zur posttranslationalen Modifikation dieses Hybrid-PCP's durch ACPS, der 4'-Phosphopantetheinyltransferase der Fettsäurebiosynthese aus *Bacillus subtilis*, führt [168]. Normale PCPs hingegen werden nicht modifiziert. Der Austausch dieser Region in



TycA-ATE (V) lieferte ein Hybridmodul, welches zwar aminoacyliert wurde aber nicht mehr epimerisierte [169]. Dies ist ein deutlicher experimenteller Hinweis, dass, wie durch die Sequenzvergleiche der PCP<sup>C</sup>s mit den PCP<sup>E</sup>s postuliert, die  $\alpha$ -Helix 2 maßgeblich an der Interaktion mit einer nachfolgenden C-terminalen E-Domäne beteiligt ist. Ein ähnlicher Ansatz, nämlich der Austausch der  $\alpha$ -Helix 2, der  $\alpha$ -Helix 3 oder beider Helices eines PCP<sup>C</sup>s gegen die entsprechenden Bereiche eines PCP<sup>E</sup>s könnte demnach zur weiteren Eingrenzung der für die Interaktion mit der E-Domäne essentiellen Reste vielversprechend sein.

### 6.3.3 Das L/D-Gleichgewicht und der Einfluss der PCPs

E-Domänen katalysieren die Umwandlung der Stereochemie des C <sub>$\alpha$</sub>  der Substrataminosäuren sowohl von L-zu-D als auch von D-zu-L. Nach einer bestimmten Zeit stellt sich dann ein Gleichgewicht zwischen enzymgebundenen L- und D-Isomeren ein. Für GrsA-ATE (V) liegt dieses Gleichgewicht bei ungefähr 65% D-Phe-S-Ppant [57] und wird sehr schnell, in weniger als zwei Sekunden, eingestellt [103]. In das Endprodukt wird aber ausschließlich D-Phe eingebaut, was durch eine Enantioselektivität der Donorstelle der nachfolgenden C-Domäne erklärt werden kann [104].

In dieser Arbeit wurden die Epimerisierungskinetiken von über zwanzig verschiedenen Enzymen untersucht. Betrachtet man die Gleichgewichte der verschiedenen Proteine, so stellt man schnell fest, dass ein komplexer Zusammenhang zwischen den verwendeten PCPs und den E-Domänen besteht. Es ist offenbar nicht so, dass jeder E-Domäne ein ganz bestimmtes Gleichgewicht zugeordnet werden kann. So besitzen die Fusionsproteine Ila und I Ib zwar beide die E-Domäne von TycA, dennoch findet man für Ila ein Gleichgewicht von 55% D-Phe-S-Ppant, während das von I Ib bei 43% D-Phe-S-Ppant lag. Der einzige Unterschied beider Proteine ist wiederum das jeweilige in ihnen enthaltene PCP. Ila enthält das PCP aus TycA, I Ib das aus TycB<sub>3</sub>. Vergleicht man die Gleichgewichte der beiden entsprechenden „wildtyp“-Module TycA-ATE (V) und TycB<sub>3</sub>-ATE (XIV) mit den Enzymen Ila und I Ib, so stellt man fest, dass ersteres ein Gleichgewicht von ~70% D-Phe-S-Ppant aufweist und letzteres ein Gleichgewicht von 40%. Somit ist Ila, welches das PCP von TycA enthält vergleichbar mit V, I Ib mit dem PCP aus TycB<sub>3</sub> vergleichbar mit XIV. Bezieht man zusätzlich das Fusionsprotein TycA-AT-TycB<sub>3</sub>-E (XVII) in die Betrachtung mit ein, so findet man ein Gleichgewicht von ~60%-D-Phe-S-Ppant, was höher liegt als das von XIV, aus dem die E-Domäne stammt, und niedriger liegt als das von V, aus dem das PCP stammt. Selbst die Mutationen im CoreT des PCP von VI hatten einen Einfluss auf die Lage des Gleichgewichtes. Für VI wurde das Gleichgewicht auf ungefähr 63%-66% D-Phe-S-Ppant

bestimmt [57, 103], einen vergleichbaren Wert zu dem, der auch für die Mutanten VII und X erhalten wurde. Die beiden Mutanten VIII und IX hingegen zeigten eine deutliche Verschiebung des Gleichgewichtes in Richtung D-Phe-S-Ppant (~80%). Noch komplizierter wird die Betrachtung, wenn man das Dimodul XI in die Betrachtung mit einbezieht. E-Domäne und PCP entsprechen den Domänen in XIV, dennoch stellte sich bei der Epimerisierung des peptidyl-S-Ppant Substrates L-Phe-L-Phe-S-Ppant durch die E-Domäne von TycB<sub>3</sub> ein Gleichgewicht von 60% L-Phe-D-Phe-S-Ppant ein, was einer deutlichen Verschiebung im Vergleich zu 40% D-Phe-S-Ppant entspricht, was für XIV gefunden wurde. Die Epimerisierung eines nicht-natürlichen Substrates (ein aminoacyl-S-Ppant Substrat anstelle des natürlichen peptidyl-S-Ppant Substrates für die E-Domäne von TycB<sub>3</sub>) führte also ebenfalls zu verschiedenen Gleichgewichten.

Wie eingangs bereits erwähnt, scheint die Lage des Gleichgewichtes zwischen enzymgebundenen L- und-D-Isomeren im Falle der Epimerisierung durch die E-Domänen aus Peptidsynthetasen durch mehrere Faktoren beeinflusst zu werden, was die ganze Betrachtung sehr komplex macht und dazu führt, dass es nicht möglich ist, eindeutige Regeln abzuleiten. Generell sollte die Lage des Gleichgewichtes einer chemischen Reaktion nur von der freien Standardenergie abhängen und somit vom Enzym unabhängig sein. Da im vorliegenden Fall aber genau genommen das gesamte Enzym das Substrat darstellt (die Aminosäuren sind enzymgebunden), hat jedes Enzym auch sein eigenes L/D-Gleichgewicht. Wahrscheinlich hängt die Position des L/D-Gleichgewichtes von der Positionierung des Substrates relativ zur E-Domäne ab, worauf, wie gezeigt, PCPs einen entscheidenden Einfluss besitzen. Schlussfolgernd lässt sich festhalten, dass offenbar die Kombination aus PCP und E-Domäne in einem komplexen Zusammenspiel die Lage des L/D-Gleichgewichtes determinieren und nicht etwa die E-Domäne alleine.

## **6.4 Entwicklung eines *in vitro* Systems zur Charakterisierung einer Peptidyl-Epimerisierungsdomäne**

### **6.4.1 Die Auswahl eines geeigneten Systems**

Es wurde beschrieben, dass Epimerisierungsdomänen von Elongationsmodulen peptidyl-S-Ppant Substrate epimerisieren [101, 102]. Das heißt, die Epimerisierung findet erst statt, nachdem die Peptidbindung mit dem elektrophilen Donorsubstrat geknüpft wurde. Ein Ziel dieser Arbeit war es, die Mechanismen aufzuklären, die für diese Reaktionsabfolge verantwortlich sind. Betrachtet man sich einmal den augenscheinlichen Unterschied eines

Initiationsmoduls zu einem Elongationsmodul, so stellt man fest, dass zur Initiation befähigte Module in der Regel keine N-terminale C-Domäne besitzen, Elongationsmodule aber immer. Ausnahmen werden später eingehend diskutiert und sollen deshalb hier nicht näher beschrieben werden. Zu Beginn dieser Arbeit war gerade eine Editierfunktion von C-Domänen postuliert worden [104]. Es wurde diskutiert, dass C-Domänen eine Art Bindungstasche mit einer weniger ausgeprägten Substratspezifität an der Donor- und einer höheren an der Akzeptorstelle besitzen. Daraus folgend wurde postuliert, dass C-Domänen womöglich das aminoacyl-S-Ppant Substrat in der Akzeptorstelle binden bis die Kondensationsreaktion mit dem „upstream“ gebundenen und sich an der Donorstelle befindlichen aminoacyl- oder peptidyl-S-Ppant erfolgt ist. Das gebildete peptidyl-S-Ppant wäre dann nicht länger ein Substrat der Akzeptorstelle und würde freigesetzt um nun seinerseits als elektrophiles Donorsubstrat für die nachfolgende C-Domäne zu fungieren. Ein solches Szenario würde das Verhindern einer unkontrollierten Mis-Initiation eines Elongationsmodules durch eine N-terminale C-Domäne beinhalten und so die beobachtete strikte gerichtete Produktsynthese auf den Enzym-Templaten erklären.

In dieser Arbeit sollte dieser Theorie nachgegangen werden und zusätzlich geklärt werden, ob es tatsächlich zwei Typen von Epimerisierungsdomänen gibt oder ob die beobachtete Epimerisierung auf Peptidylstufe auf die postulierte Bindung des aminoacyl-S-Ppant Substrates in der Akzeptorstelle der N-terminalen C-Domäne bis zur erfolgten Kondensationsreaktion zurückzuführen ist.

Für derartige Untersuchungen stand kein geeignetes System zur Verfügung, so dass dieses zunächst entwickelt werden musste. Gesucht wurde ein möglichst kleines, rekombinant in *E. coli* zu exprimierendes System, welches am zweiten Modul eine peptidyl-E-Domäne besitzen sollte und für *in vitro* Untersuchungen geeignet war. Außerdem war es wünschenswert, ein zur Produktabspaltung befähigtes System zu haben, um die Effizienz des Einbaus von L- bzw. D-Aminosäuren in Produkte sowie das Zusammenspiel der verschiedenen Domänen, in einer Vielzyklenkatalyse studieren zu können. Folglich wurde ein weiteres Modul, ein Terminationsmodul, benötigt, welches sich durch das Vorhandensein einer Terminationsdomäne, an seinem C-terminalen Ende auszeichnet.

Das Tyrocidin-Biosynthesystem, welches aus den drei Genen *tycA*, *tycB* und *tycC* besteht, die für die drei Tyrocidin Synthetasen TycA, TycB und TycC kodieren [15], schien die an das *in vitro* System vorab gestellten Anforderungen am ehesten zu erfüllen. Das Tyrocidin-Biosyntheseoperon, sowie das entwickelte *in vitro* System sind schematisch in Abbildung 5-

13 dargestellt. Im Modul TycB<sub>3</sub>, direkt am Übergang von TycB auf TycC, befindet sich eine peptidyl-E-Domäne. Für das zu entwickelnde *in vitro* System wurde dieses Modul, sowie das jeweilige dazu N- und C-terminale Modul gewählt. Das C-terminale Modul ist bereits Bestandteil von TycC und lag somit *in trans* zu dem Dimodul aus TycB vor, was die Handhabung des Systems bei der Klonierung und der Expression in *E. coli* erleichterte, da mit kleineren DNA-Konstrukten und Proteinen gearbeitet werden konnte. TycC besteht aus sechs Modulen, TycC<sub>1</sub> ist also natürlicherweise kein Terminationsmodul und somit nicht zur Produktfreisetzung befähigt. In der Literatur gab es aber bereits Beispiele für die Fusion einer Te-Domäne an PCPs, die zu der Abspaltung neuer verkürzter Produkte führten [88]. Folglich wurde als Strategie zur Umwandlung von TycC<sub>1</sub> zu einem Terminationsmodul die Fusion der Te-Domäne von TycC<sub>6</sub> direkt an das C-terminale Ende des PCPs von TycC<sub>1</sub> gewählt. Zeitgleich zu dieser Arbeit kamen noch weitere Beispiele für erfolgreiche Te-Domänen-Fusionen hinzu [89-91]. Es zeigte sich, dass das entwickelte System in der Tat allen vorab gestellten Anforderungen genügte und dass die fusionierte Te-Domäne aktiv war.

#### **6.4.2 Die C-Domäne verhindert Mis-Initiation und legt den Zeitpunkt der Epimerisierung fest**

Mit dem *in vitro* System sollte untersucht werden, ob eine N-terminale C-Domäne eine interne Mis-Initiation verhindert und ob durch den gleichen Mechanismus der Zeitpunkt der Epimerisierungsreaktion determiniert wird. Darüber hinaus kam noch ein weiterer Aspekt hinzu, nämlich die *de novo* Dipeptidsynthese *in cis* (Phe-Phe) sowie die Di- und Tripeptidbildung *in trans* (Phe-Asn, Phe-Phe-Asn). Hierzu wurden verkürzte rekombinate NRPS von TycB erzeugt und es wurde untersucht, wie effizient diese eine Elongationsreaktion auf TycC<sub>1</sub>-CAT (XV) oder TycC<sub>1</sub>-CAT/Te (XVI) initiieren können. Anhand der verschiedenen großen TycB-Derivate TycB<sub>2-3</sub>-AT.CATE (XI), TycB<sub>2-3</sub>-T.CATE (XII), TycB<sub>3</sub>-CATE (XIII) und TycB<sub>3</sub>-ATE (XIV), die sich jeweils durch die Verkürzung um genau eine Domäne voneinander unterschieden, konnte gezeigt werden, dass ein Elongationsmodul anscheinend einfach durch Deletion seiner N-terminalen C-Domäne in ein Initiationsmodul umgewandelt werden kann.

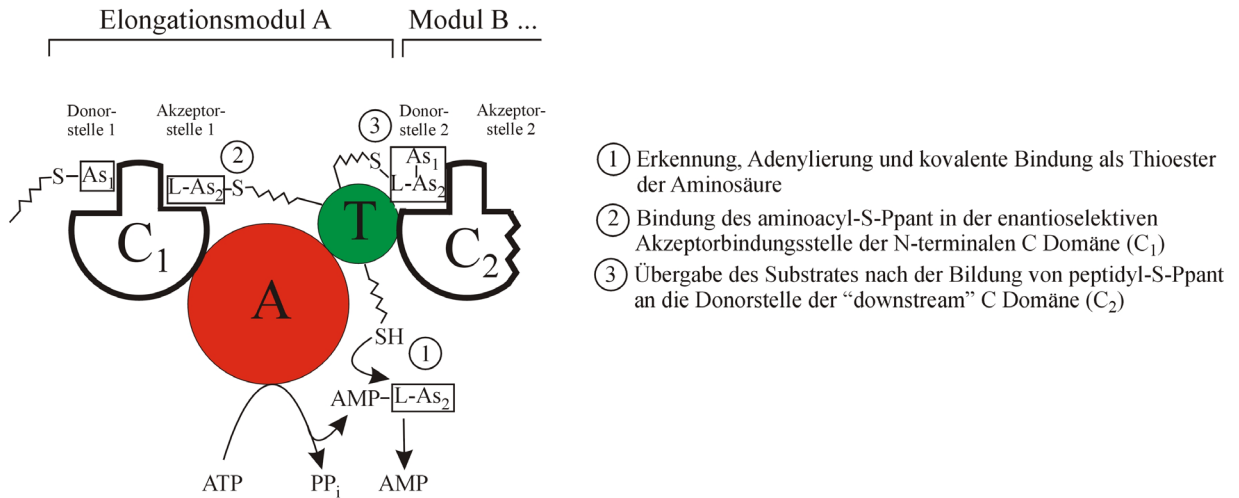
Die Initiationsaktivitäten von XII und XIII waren sehr niedrig verglichen mit XI und XIV, wenn L-Phe als Substrat verwendet wurde. Die beiden erstgenannten Enzyme besitzen eine N-terminale C-Domäne, die in den beiden initiierenden rekombinanten Enzymen XI und XIV fehlt. Dies deutet darauf hin, dass offenbar diese N-terminale C-Domäne für die fehlende Initiationsfähigkeit von XII und XIII verantwortlich zu machen ist. Wurde hingegen D-Phe als

Substrataminosäure eingesetzt, so waren alle vier Enzyme zur Initiation befähigt. Mit dem Dimodul XI als Donorenzym wurde mit D-Phe als Substrat das Dipeptid D-Phe-L-Asn als Hauptprodukt gebildet, wobei die Produktbildungsraten vergleichbar zu XIV waren. Ein Tripeptid war nicht unbedingt zu erwarten. Zum einen wurde mit den Proteinen Ia und Ib im ATP-PP<sub>i</sub>-Austausch gezeigt, dass die A-Domäne von TycB<sub>2</sub>, die Bestandteil des Dimoduls XI ist, so gut wie kein D-Phe aktiviert. Zum anderen war nicht davon auszugehen, dass die C-Domäne von TycB<sub>3</sub> in der Donorstelle D-Phe prozessieren kann. Zusammenfassend stärken diese Beobachtungen die Theorie, dass offenbar die N-terminale C-Domäne das aminoacyl-S-Ppant Substrat in einer enantioselektiven Donor-Bindungstasche festhält bis die Kondensationsreaktion stattgefunden hat (vergleiche Abbildung 6-2-A). D-Phe-S-Ppant ist aber offenbar kein Substrat dieser Bindungstasche, so dass mit D-Phe als Substrat alle vier Enzyme die Dipeptidbildung initiieren konnten. Dieses Ergebnis steht im Einklang zu der Beobachtung, die bei der zellfreien *in vitro* Biosynthese von Surfactin gemacht wurde. Obwohl D-Leu aktiviert wurde, unterstützte dieses die Surfactin Biosynthese nicht [17], was nun damit erklärt werden kann, dass aufgrund der gefundenen Spezifität der Akzeptorbindungsstelle von C-Domänen D-Leu offenbar nicht gebunden wurde und eine Katalyse der Peptidbindungsbildung somit nicht möglich war.

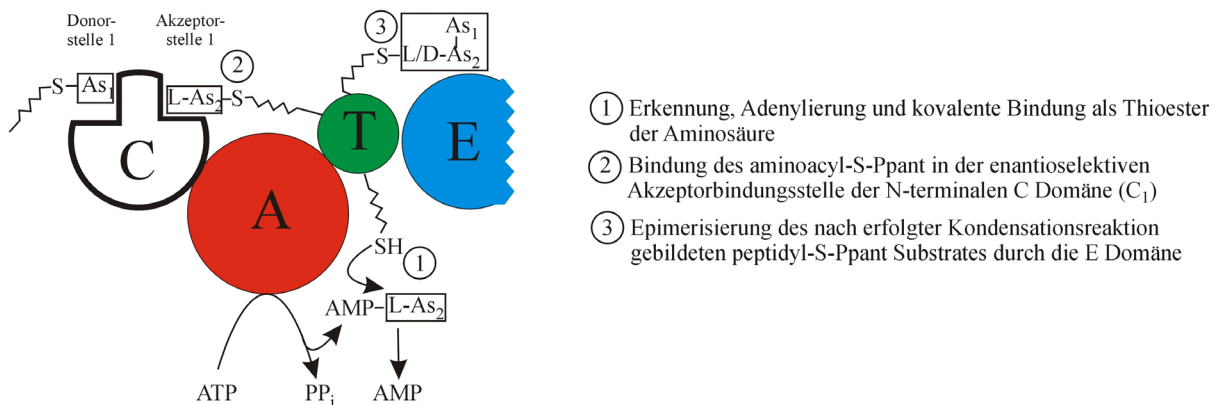
Experimentell belegt werden konnte also die Vermeidung einer Mis-Initiation durch Bindung des L-aminoacyl-S-Ppant Substrates in der Akzeptorbindungsstelle der C-Domäne. Man könnte sich aber auch vorstellen, dass C-Domänen eine Selektivität für die Länge und Zusammensetzung der elektrophilen Donorsubstrate besitzen. Wenn C-Domänen zwischen einem aminoacyl-S-Ppant und einem peptidyl-S-Ppant Substrat unterscheiden könnten, so könnte eine Mis-Initiation eines Akzeptormoduls ebenfalls wirkungsvoll unterdrückt werden, da die nachfolgende „downstream“ C-Domäne ein peptidyl-S-Ppant Substrat anstelle eines aminoacyl-S-Ppant Substrates erwarten würde. In diesem Szenario würde die Mis-Initiation durch eine Selektivität der Donorbindungsstelle unterdrückt werden. Die C-Domänen von TycB<sub>3</sub> und TycC<sub>1</sub> prozessieren natürlicherweise ein tripeptidyl-S-Ppant bzw. tetrapeptidyl-S-Ppant Substrat (vergleiche Abbildung 5-13-A). Es konnte aber anhand der Untersuchungen mit dem *in vitro* System eindeutig gezeigt werden, dass die C-Domänen von TycB<sub>1</sub> und TycC<sub>1</sub> sowohl aminoacyl-S-Ppant als auch peptidyl-S-Ppant Substrate akzeptieren. C-Domänen besitzen also in ihren Akzeptorbindungsstellen offenbar keine ausgeprägte Spezifität für die Länge und die Zusammensetzung der elektrophilen Donorsubstrate. Schlussfolgernd scheint das soeben diskutierte Szenario wohl nicht zuzutreffen, wenn auch nicht ganz auszuschließen

ist, dass die Produktbildungsraten für die natürlichen peptidyl-S-Ppant Substrate größer wären als die für die verkürzten Substrate beobachteten.

### A) Verhinderung interner Mis-Initiation



### B) Zeitpunkt der Epimerisierung



### Abbildung 6-2: Modell für die Rolle einer N-terminalen C-Domäne bei der Verhinderung interner Mis-Initiation sowie für ihren Einfluss auf den Zeitpunkt der Epimerisierung

Das gebildete L-aminoacyl-S-Ppant (gebildet nach Erkennung und Adenylierung der Substrataminosäure durch die A-Domäne) ist ein Substrat der kognaten N-terminalen C-Domäne des Moduls und wird von dieser direkt nach der Bildung von einer enantioselektiven Akzeptorbindungsstelle gebunden. Bei der Kondensationsreaktion mit einem „upstream“ Substrat wird ein peptidyl-S-Ppant gebildet, welches nicht länger ein Substrat dieser C-Domäne ist und folglich freigesetzt wird. Das peptidyl-S-Ppant kann nun entweder seinerseits als elektrophiles Donorsubstrat von einer „downstream“ C-Domäne umgesetzt werden (A) oder bei Vorhandensein einer E-Domäne epimerisiert werden (B). Ein entsprechendes D-aminoacyl-S-Ppant ist kein Substrat der Akzeptorstelle der N-terminalen C-Domäne. Die Konsequenz wäre eine interne Mis-Initiation, die in verkürzten Produkten resultieren würde.

An dieser Stelle sollen einige auffällige NRPS-Biosynthesecluster diskutiert werden, deren Domänenanordnungen auf den ersten Blick anscheinend nicht mit der anhand der Ergebnisse entwickelten Theorie in Einklang zu bringen sind. So besitzen einige natürliche NRPS Biosynthesesysteme N-terminale Kondensationsdomänen und können trotzdem initiieren. Dazu gehören die Cyclosporin Synthetase (CYSYN) [25, 170] sowie die Actinomycin Synthetase II (ACMS II) [171]. Die Lysergyl Peptidsynthetase 1 (LPS 1) ist hingegen nicht initiationsfähig obwohl sie keine N-terminale C-Domäne besitzt und mit einer A-Domäne beginnt [172]. Betrachtet man sich diese Beispiele allerdings genauer, so lassen sich in allen Fällen plausible Erklärungen finden, die zu dem vorgeschlagenen Modell passen und es teilweise sogar noch festigen. Bei der Cyclosporin-Synthetase zum Beispiel wird die Aminosäure D-Ala nicht durch eine E-Domäne, sondern durch eine externe Racemase aus L-Ala erzeugt und direkt von einer D-Ala spezifischen A-Domäne, die direkt im Anschluss an die erwähnte N-terminale C-Domäne folgt, adenyliert [128]. Wie im vorgeschlagenen Modell postuliert, könnte es sein, dass die enantioselektive Akzeptorbindungsstelle dieser N-terminalen C-Domäne nicht dazu in der Lage ist D-Ala-S-Pant effizient zu binden, so dass eine Initiation erfolgen kann. Auf der anderen Seite ist die putative N-terminale C-Domäne von CYSYN nicht gut konserviert, was fraglich erscheinen lässt, ob es sich überhaupt um eine C-Domäne im eigentlichen Sinne handelt. Möglicherweise dient dieses N-terminale Anhängsel auch zur Vermittlung des Protein-Protein-Kontaktes mit der externen Racemase, die das D-Ala bereitstellt oder aber sie ist involviert in die abschließende Zyklisierungsreaktion. Für ACMS II, welches hingegen mit Sicherheit eine intakte N-terminale C-Domäne besitzt, wurde ebenfalls eine Initiationsfähigkeit beschrieben [165, 171]. Allerdings wurden für diese „Mis-Initiation“ keine Produktbildungsraten bestimmt, wohl aber erwähnt, dass die Produktbildungsraten im Vergleich zum natürlichen System vermindert waren. Das entspricht ebenfalls den in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnissen, haben doch TycB<sub>2-3</sub>-T.CATE (XII) und TycB<sub>3</sub>-CATE (XIII) zwar sehr stark verringerte aber doch noch messbare Initiationsfähigkeit gezeigt. Möglicherweise sind solche Restaktivitäten auf die *in vitro* Reaktionsbedingungen zurückzuführen. Bei LPS 1 scheint die Sachlage allerdings etwas komplexer zu sein. *In vitro* Untersuchungen mit den Enzymen LPS 1 und LPS 2 zeigten keinerlei Initiationsfähigkeit von LPS 1 bei Fehlen von D-Lysergsäure, dem Substrat der Initiationssynthetase LPS 2 [172]. Möglicherweise liegen die Enzyme LPS 1 und LPS 2 als Komplex mit einer hohen Dissoziationskonstante vor, so dass die C-terminale C-Domäne von LPS 2 die Mis-Initiation von LPS 1 wirkungsvoll unterdrückt. Es kann aber nicht

ausgeschlossen werden, dass in diesem System ein anderer Mechanismus, wie zum Beispiel die oben diskutierte Selektivität der Donorstelle der C-Domäne für peptidyl-S-Ppant Substrate, zur Vermeidung von Mis-Initiation realisiert ist. Interessant sind in diesem Zusammenhang auch die Mycosubtilin Synthetasen MycA, MycB und MycC (vergleiche Abbildung 2-2) [53]. MycA und MycB enden, vergleichbar zu LPS 2, C-terminal beide mit einer kompletten C-Domäne. Am N-Terminus von MycB und MycC konnten jedoch zusätzlich Bereiche identifiziert werden, die große Homologien zu der C-terminalen Hälfte von C-Domänen aufweisen. Deren Funktion war bisher unklar. Legt man jedoch das hier vorgeschlagene Modell zu Grunde, so kann vermutet werden, dass diese N-terminalen Anhängsel eine Akzeptorbindestelle von C-Domänen enthalten und auf diese Weise eine Mis-Initiation von MycB<sub>1</sub> und MycC<sub>1</sub> vermieden wird.

Nachdem die Rolle der N-terminalen C-Domäne zur Vermeidung interner Mis-Initiation belegt werden konnte, sollte nun der Frage nachgegangen werden, ob der gleiche Mechanismus auch die Epimerisierung auf peptidyl-S-Ppant Stufe erzwingt. Es zeigte sich, dass mit L-Phe als Substrat die Epimerisierungsaktivitäten von XII und XIII, die beide eine N-terminale E-Domäne besitzen, dramatisch kleiner waren als die von XIV ohne N-terminale C-Domäne. Mit D-Phe als Substrat bot sich auch im Falle der Epimerisierung ein etwas anderes Bild. Die Enzyme XII und XIII schienen zwar geringfügig langsamer zu sein als XIV waren aber prinzipiell miteinander vergleichbar und erreichten in annähernd der gleichen Zeit eine identische Gleichgewichtsposition für L-Phe-S-Ppant und D-Phe-S-Ppant. Dies lässt den Schluss zu, dass der gleiche Mechanismus, der die interne Mis-Initiation verhindert, auch bewirkt, dass die Epimerisierung erst nach erfolgter Peptidbindungsbildung und daraus resultierender Freisetzung von peptidyl-S-Ppant aus der Akzeptorbindungsstelle der N-terminalen C-Domäne erfolgt. Ein Modell für diesen Mechanismus ist schematisch in Abbildung 6-2-B dargestellt.

Die Tatsache, dass die Enzyme XII und XIII sowohl bei der Dipeptidbildung als auch bei der Untersuchung der Epimerisierungsreaktion im Vergleich zu XIV geringfügig geringere Aktivitäten zeigten, deutet möglicherweise darauf hin, dass die postulierte Enantioselektivität der Akzeptorbindungstasche der C-Domäne nicht absolut ist, sondern dass das entsprechende D-Isomer nur sehr viel schlechter gebunden wird.



## 6.5 Aminoacyl- versus peptidyl-E-Domäne

### 6.5.1 Gibt es zwei Klassen von E-Domänen ?

Anhand der peptidyl-E-Domäne aus TycB<sub>3</sub> zeigte sich, dass diese E-Domäne prinzipiell dazu in der Lage ist, sowohl peptidyl-S-Ppant Substrate, wie für XI gezeigt, als auch aminoacyl-S-Ppant Substrate zu epimerisieren. Ebenso konnte nachgewiesen werden, dass im natürlichen System die Epimerisierung immer erst nach erfolgter Peptidbindungsbildung mit dem „upstream“ Substrat stattfindet und die C-Domäne durch Bindung des aminoacyl-S-Ppant in der Akzeptorstelle diese Reaktionsabfolge bestimmt. Vergleicht man hingegen die Epimerisierungskinetiken des aminoacyl-S-Ppant Substrates L-Phe-S-Ppant (Enzym XIV) mit der von L-Phe-L-Phe-S-Ppant (Enzym XI), einem peptidyl-S-Ppant Substrat, so stellt man fest, dass die Reaktion im ersten Fall sehr viel langsamer verläuft. Für peptidyl-S-Ppant war das L/D-Gleichgewicht bereits nach dreißig Sekunden (kürzeste gemessene Zeit) erreicht, während es für aminoacyl-S-Ppant annähernd zehn Minuten dauerte. Das Gleichgewicht ist auch ein anderes, was weiter oben bereits diskutiert wurde. Enzym XIV war zwar in der Lage das aminoacyl-S-Ppant Substrat zu epimerisieren, aber selbst bei der Produktbildungsreaktion mit TycC<sub>1</sub>-CAT/Te (XXVII) wurde ein Gemisch aus L/D-Phe-L-Asn gefunden (Verhältnis 2:1), während mit XI ausschließlich das erwartete Tripeptid L-Phe-D-Phe-L-Asn gebildet worden war, in dem das Phe in Position zwei die D-Konfiguration besitzt. Dieser Befund kann auf zwei Effekte zurückzuführen sein, die möglicherweise miteinander kombiniert sind. Zum einen kann dieses Ergebnis natürlich auf die verminderte Epimerisierungsaktivität von XIV zurückzuführen sein. Zum anderen kann es aber auch sein, dass die Enantioselektivität der C-Domäne von TycC<sub>1</sub>, deren natürliches Substrat ein tetrapeptidyl-S-Ppant ist, im Falle von L/D-Phe-S-Ppant vermindert ist. Was dafür spricht ist die Tatsache, dass das L/D-Gleichgewicht bei der Epimerisierungskinetik annähernd bei 2:1 liegt und somit dem im Produkt gefundenen Verhältnis entspricht. Was allerdings dagegen spricht ist, dass mit D-Phe ausschließlich D-Phe-L-Asn nachgewiesen werden konnte.

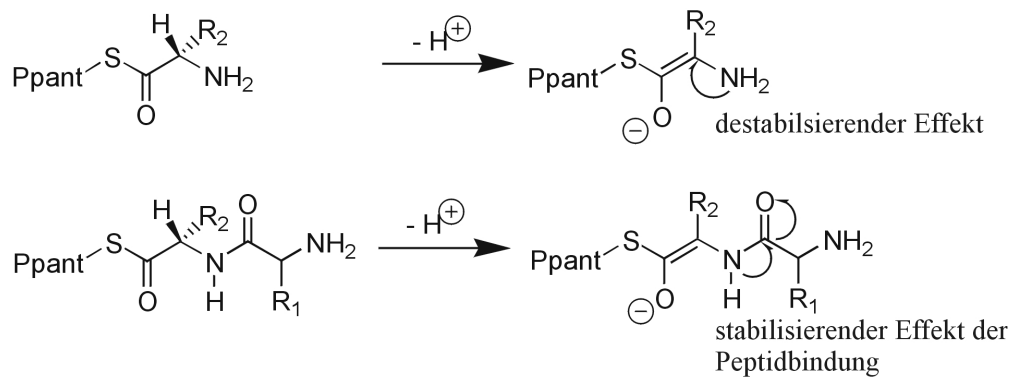
Das auf XI basierende Fusionsprotein TycB<sub>2-3</sub>-AT.CAT/E (XXV) enthält anstatt der peptidyl-E-Domäne aus TycB<sub>3</sub> die aminoacyl-E-Domäne aus TycA. Auch hier konnte mit L-Phe als Substrataminosäure ein L-Phe-D-Phe Dipeptid nachgewiesen werden. Es hat also den Anschein, dass eine aminoacyl-E-Domäne prinzipiell auch peptidyl-S-Ppant Substrate epimerisieren kann. Die Elongationsversuche (vergleiche Ergebnisse 5.5) dieses Proteins mit dem Akzeptorenzym TycB<sub>1</sub>-CAT/Te (XXVII) zeigten aber nicht das erwartete Tripeptid,

sondern die verkürzten, durch „Mis-Initiation“ entstandenen Produkte DKP (Akzeptorsubstrat L-Pro) bzw. lineares D-Phe-L-Abu (Akzeptorsubstrat: L-Abu). Möglicherweise besitzt eine aminoacyl-E-Domäne also eine wesentlich stärkere Affinität zu aminoacyl-S-Ppant als die Akzeptorstelle einer C-Domäne. Ist dann verfrüht, vor der Peptidbindungsbildung mit dem „upstream“ Substrat, D-Phe-S-Ppant gebildet worden, so kommt es zur Mis-Initiation, da D-Phe-S-Ppant nicht effizient von der Akzeptorbindestelle der zugehörigen N-terminalen C-Domäne gebunden wird (vergleiche Ergebnisse 5.4.4). Somit erscheint fraglich, ob in diesem unnatürlichen Spezialfall die Epimerisierung wirklich erst nach erfolgter Peptidbindungsbildung erfolgt oder ob bei Fehlen eines geeigneten Akzeptorenzyms zur Elongation letztere nach der Epimerisierungsreaktion mit geringer Effizienz abläuft.

Zusammenfassend muss festgestellt werden, dass es, obwohl der Einfluss einer N-terminalen C-Domäne auf die Epimerisierungsreaktion eines Elongationsmodules zweifelsfrei nachgewiesen werden konnte, offenbar doch einen funktionalen Unterschied zwischen aminoacyl- und peptidyl-E-Domänen gibt.

### **6.5.2 Mögliche mechanistische Unterschiede – ein Modell für die abweichende Reaktivität**

Über den Mechanismus der Epimerisierungsreaktion ist, trotz eingehender Mutationsstudien, noch wenig bekannt [57]. Chemisch betrachtet gilt es aber als sicher, dass für die Epimerisierung des  $C_{\alpha}$  ein Proton abstrahiert werden muss, was in der Bildung eines Carbanion-Intermediates resultiert. Dieser planare Übergangszustand wird dann entweder von der gegenüberliegenden Seite (Zwei-Basen-Mechanismus) oder aber nach Drehung (Ein-Basen-Mechanismus) wieder protoniert. Ein möglicher Grund für die verminderte aminoacyl-S-Ppant Epimerisierungsaktivität der E-Domäne von TycB<sub>3</sub> könnte in der unterschiedlichen Elektronendichteverteilung eines aminoacyl-S-Ppant Carbanions verglichen mit einem peptidyl-S-Ppant Carbanion und der damit verbundenen Stabilisierung der Übergangszustände begründet sein. Die Stabilisierung der Übergangszustände ist in Abbildung 6-3 gezeigt. Ein aminoacyl-S-Ppant Carbanion ist dabei schlechter stabilisiert als ein entsprechendes peptidyl-S-Ppant Carbanion. Die hohe Elektronendichte des freien Elektronenpaares der Aminogruppe von aminoacyl-S-Ppant destabilisiert das Carbanion-Intermediat. Auf Peptidylstufe ist dieses freie Elektronenpaar durch die Peptidbindung resonanzstabilisiert, so dass der destabilisierende Effekt auf den Carbanion-Übergangszustand drastisch geringer ausfallen dürfte. Folglich müssen aminoacyl-E-Domänen den Übergangszustand etwas anders stabilisieren als peptidyl-E-Domänen.



**Abbildung 6-3: Aminoacyl- versus peptidyl-S-Ppant Epimerisierung**

Diese Modell zeigt den destabilisierenden Effekt des freien Elektronenpaares der Aminogruppe des aminoacyl-S-Ppant auf das bei der Epimerisierung gebildete Carbanion-Intermediat. Im Gegensatz dazu fehlt dieser destabilisierende Effekt auf das Carbanion-Intermediat bei der Epimerisierung eines peptidyl-S-Ppant weitestgehend, da das freie Elektronenpaar der Aminogruppe durch die Peptidbindung mesomeriestabilisiert ist.

## 6.6 Protein-Protein-Erkennung und kombinatorische Ansätze zur Erzeugung neuer Produkte

### 6.6.1 Die *in trans* Protein-Protein-Interaktion zweier NRPS

Bei der Untersuchung der GrsA-CoreT Mutanten VII, VIII, IX und X und des Wildtyps VI im DKP-Bildungsassay war aufgefallen, dass die Produktbildungsraten bei Erhöhung der TycB<sub>1</sub>-CAT (XVI) Konzentration anstiegen. Ein Maximum wurde bei einem in etwa 20-fachen Überschuss erreicht. Die Erhöhung der Menge an VI bei gleichzeitig konstanter Menge an XXVI lieferte jedoch keine gesteigerten Produktausbeuten. Die Zyklisierung und die daraus resultierende Produktabspaltung von DKP verläuft unkatalysiert. Es ist daher davon auszugehen, dass es sich um eine langsame Reaktion handelt, die geschwindigkeitsbestimmend ist, was durch den experimentellen Befund belegt wird. Interessant ist das Ergebnis trotzdem, sagt es doch etwas über die Protein-Protein-Interaktion zwischen zwei NRPS aus. GrsA-ATE (VI) muss offenbar mit mehreren verschiedenen Molekülen von XXVI interagieren, andernfalls hätte die Erhöhung der Menge an XXVI nicht so einen dramatischen Effekt auf die Produktbildungsraten. Das wiederum bedeutet, dass die Protein-Protein-Interaktion nicht statisch, sondern vielmehr flexibel sein muss. Es können keine festen Komplexe vorliegen, sondern Dissoziation und Reassoziierung bestimmen das Bild.

Damit dieser Prozess wirkungsvoll abläuft, müssen sich die Synthetasen aber effizient erkennen. In den verwandten, ebenfalls multimodular aufgebauten Polyketidsynthetasen, konnten experimentelle Daten gesammelt werden, die auf Linkerregionen an den N- und C-terminalen Enden von Synthetasen hindeuten. Für NRPS wurden solche Linker bisher nicht nachgewiesen. Wohl aber konnte gezeigt werden, dass GrsA-ATE (VI), entfernt man die E-Domäne, nicht mehr in der Lage ist mit TycB<sub>1</sub>-CAT (XXVI) DKP zu bilden, selbst wenn es mit D-Phe aminoacyliert wird [52]. Wird hingegen die E-Domäne durch eine Punktmutation ausgeschaltet, so erfolgt bei Aminoacylierung mit D-Phe eine Produktbildung [57]. Die in dieser Arbeit konstruierten Fusionsproteine, sowie die Entwicklung des *in vitro* Systems des Übergangs von TycB auf TycC erlaubten eine eingehende Untersuchung der Protein-Protein-Erkennung im Tyrocidin-Biosynthesesystem. TycB<sub>3</sub>-ATE (XIV) zum Beispiel, obwohl es die Domänenanordnung von TycA-ATE (V) und GrsA-ATE (VI) besitzt, war nicht dazu in der Lage, eine Produktbildung mit dem unnatürlichen Substrat TycB<sub>1</sub>-CAT (XXVI) zu initiieren. Hingegen funktionierte die Produktbildung im Falle des natürlichen Akzeptors TycC<sub>1</sub>-CAT (XVI). Ein vergleichbares Bild bot sich für TycA-ATE (V) als Donor. Eine Produktbildung wurde nur mit dem natürlichen Partner TycB<sub>1</sub>-CAT (XXVI) beobachtet, jedoch nicht mit TycC<sub>1</sub>-CAT/Te (XVI). Die Fusionsproteine Ia (TycB<sub>2</sub>-A/TE), IIa (TycB<sub>3</sub>-A/TE) und IIb (TycB<sub>3</sub>-AT/E) bildeten kein Produkt mit TycC<sub>1</sub>-CAT/Te (XVI), dafür aber nun mit TycB<sub>1</sub>-CAT (XXVI). All diese Ergebnisse bestätigen die oben beschriebenen zuvor erhaltenen Ergebnisse, dass offenbar die Protein-Protein-Erkennung auf der Donorseite von der C-terminalen E-Domäne vermittelt wird. Anscheinend besitzt die Donorstelle der C-Domäne von TycB<sub>1</sub>-CAT (XXVI) neben der Enantioselektivität eine weitergehende Substratspezifität für das Donorprotein. Erstaunlicherweise interagierte TycA-AT-TycB<sub>3</sub>-E (XVII) aber nicht nur wie erwartet mit TycC<sub>1</sub>-CAT/Te (XVI), sondern auch mit TycB<sub>1</sub>-CAT (XXVI). Es ist also nicht auszuschließen, dass an einer effizienten Protein-Protein-Erkennung mehr als eine Domäne beteiligt ist. Das wiederum würde bedeuten, dass ähnliche Linkerregionen, wie sie in PKS-Systemen gefunden wurden, für NRPS nicht existieren oder zumindest keine so große Rolle spielen, sondern dass die spezifische Erkennung wohl eher über die gesamte dreidimensionale Struktur vermittelt wird. Für diese Variante spricht auch, dass man in Sequenzvergleichen von NRPS bestenfalls Linkerregionen mit einer Länge von bis zu 15 Aminosäuren vermuten könnte [173], während die PKS-Linker 60-70 Aminosäuren groß sind. Es ist fraglich, ob solch kurze „Linker“ von nur 15 Aminosäuren Länge überhaupt zur

Vermittlung einer effizienten Protein-Protein-Erkennung ausreichen würden. Endgültige Klarheit können aber wohl nur weitere Experimente bringen.

### **6.6.2 Kombinatorik mit NRPS-Modulen und Domänen – ein langfristiges Ziel mit vielen Hindernissen**

Noch vor einigen Jahren glaubte man, dass die Zusammensetzung der von NRPS synthetisierten Produkte einzig und alleine durch die Selektivität der A-Domänen bestimmt würde. Folglich wurde versucht, durch den Austausch von A-Domänen oder auch von ganzen Modulen in Biosynthesystemen, aufgrund der genetischen Zugänglichkeit bevorzugt in *Bacillus subtilis*, *in vivo* neue Produkte mit veränderten Eigenschaften produzieren zu können, wobei man schon sehr schnell an Grenzen stieß und mit damals noch unerklärlichen Inaktivitäten zu kämpfen hatte [60, 163, 174, 175]. Daraufhin ging man dazu über, zunächst kleinere Systeme *in vitro* zu studieren, da hier die Zusammenhänge einfacher durchschaut werden können. Auf diese Weise konnten erste Erfolge erzielt werden [89, 90], dennoch gab es nach wie vor viele Schwierigkeiten und Ungereimtheiten [164].

Inzwischen wurde neben der Selektivität der A-Domänen auch eine Selektivität der C-Domänen postuliert [104], die bereits diskutiert wurde. Die Ergebnisse dieser Arbeit geben weitere Hinweise auf eine solche Selektivität der C-Domäne. Insbesondere die Spezifität der Akzeptorstelle ist dabei essentiell. Nicht nur, dass die Katalyse der Kondensation eventuell nicht mehr funktionieren würde, es würden bei Inkompatibilitäten der Akzeptorbindestelle der C-Domänen mit der jeweiligen Substrataminosäure auch verkürzte und unerwünschte Produkte durch Mis-Initiation entstehen, wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte. So scheint es für Modulfusionen unumgänglich zu sein, jeweils die N-terminale C-Domäne mit der geforderten Spezifität in der Akzeptorbindestelle mit zu transferieren. Hierfür gibt es bereits ein erfolgreiches Beispiel [89]. Aber auch Probleme mit der Donorbindestelle der C-Domäne, die zumindest eine Enantioselektivität aufweist [104], scheinen vorprogrammiert. So konnte mit den beiden Fusionsproteinen TycC<sub>4</sub>-A/TE (IIIa) und BacA<sub>1</sub>-A/TE (IVa), obwohl sie epimerisierungsaktiv waren, keinerlei Produkt im Elongationsassay mit TycB<sub>1</sub>-CAT –weder linear noch zyklisch– nachgewiesen werden. Dies war etwas überraschend, wurde doch bereits gezeigt, dass D-Ala in D-Ala-L-Pro-DKP eingebaut wird [104]. Somit scheinen C-Domänen bei kombinatorischen Ansätzen einen äußerst kritischen Teil darzustellen, da man nicht nur eine, sondern gleich zwei Selektivitäten zu beachten hat.

Eine weitere Idee war die Nutzbarmachung von E-Domänen für kombinatorische Ansätze, zum einen, weil D-Aminosäuren für die Bioaktivität sehr wichtig zu sein scheinen [1], zum

anderen weil sie oftmals am C-Terminus von Synthetasen vorkommen und dadurch, was in dieser Arbeit experimentell bestätigt werden konnte, zumindest an der Vermittlung des Protein-Protein-Kontaktes beteiligt sind. Hier muss aber auch schon wieder einschränkend die in dieser Arbeit eindeutig belegte geänderte Reaktivität von aminoacyl- versus peptidyl-Epimerasen beachtet werden. Die Rolle des PCP's ist bei E-Domänen-Fusionen ebenfalls kritisch zu betrachten, da diese, wie gezeigt, nur in Kombination mit einem PCP<sup>E</sup> aktiv sind.

Weniger kritisch scheint die A-PCP Interaktion zu sein, so dass es sich hierbei um eine weitere potentielle Fusionsstelle für kombinatorische Ansätze handelt. Ihre Verwendbarkeit zu diesem Zweck wurde ebenfalls bereits nachgewiesen [90]. Aber auch hier muss man zumindest mit einem Aktivitätsverlust rechnen, da auch diese Interaktion, wie in dieser Arbeit auch gezeigt, optimiert zu sein scheint. Drei Fusionsproteine (XVIII, XIX und XX) mit der Fusionsstelle zwischen A-Domäne und PCP wurden überhaupt nicht aminoacyliert, wenn auch die Gründe dafür nicht näher untersucht wurden, andere wurden langsamer aminoacyliert als vergleichbare Proteine mit natürlicher A-PCP-Interaktion.

Für eine erfolgreiche Kombinatorik müssten also aus dem inzwischen großen Pool vorhandener NRPS-Cluster die jeweils geeigneten Module, das heißt Module mit der gewünschten A-Domänen-Spezifität, wenn möglich mit allen notwendigen Modifikationsdomänen, ausgewählt werden und neu miteinander kombiniert werden. Dabei sollte darauf geachtet werden, dass an ihrem natürlichen N-Terminus die gleiche A-Domäne (Selektivität) zu finden ist wie die des Moduls an das sie fusioniert werden sollen. Auf diese Weise könnte man alle bisher bekannten Selektivitätsprobleme und Probleme mit Fusionsstellen vermeiden. Die entscheidende Einschränkung hierbei ist allerdings, dass die bekannten Biosynthesecluster aus vielen verschiedenen Organismen stammen, die aufgrund spezieller Anforderungen an den Wirtsorganismus oftmals in heterologen Expressionssystemen nicht löslich oder aktiv sind, so dass bisher nur ein winziger Bruchteil der bekannten Module überhaupt kombinatorisch verwendbar ist. Aber auch bei der Suche nach geeigneten Expressionssystemen wurden bereits Fortschritte erzielt [176, 177]. So konnte zum Beispiel *Bacillus subtilis* zur Produktion von Bacitracin aus *Bacillus licheniformis* verwendet werden. Hierbei tauchte ein weiteres Problem auf, nämlich das der Resistenz gegen das produzierte Produkt. Für neue Stoffe kann es sein, dass diese gegen den eignen Wirtsorganismus antibiotisch wirken, ohne dass geeignete Transport- oder resistenzvermittelnde Systeme vorlägen.

Zusammenfassend muss man feststellen, dass auf dem Weg zur Biosynthese neuer Wirkstoffe mittels gezielt entwickelter NRPS noch sehr viele Schwierigkeiten und Probleme gelöst werden müssen, was aber ohne Zweifel machbar sein wird, wenn dieser äußerst interessanten und faszinierenden Klasse von Enzymen weitere Geheimnisse entlockt werden...

## 7 Anhang

### Anhang A – Proteinübersicht

Ia	TycB <sub>2</sub> -A/TE
Ib	TycB <sub>2</sub> -AT/E
IIa	TycB <sub>3</sub> -A/TE
IIb	TycB <sub>3</sub> -AT/E
IIIa	TycC <sub>4</sub> -A/TE
IIIb	TycC <sub>4</sub> -AT/E
IVa	BacA <sub>1</sub> -A/TE
IVb	BacA <sub>1</sub> -AT/E
V	TycA-ATE
VI	GrsA-ATE
VII	GrsA-ASI
VIII	GrsA-HSI
IX	GrsA-HSL
X	GrsA-DSL
XI	TycB <sub>2-3</sub> -AT.CATE
XII	TycB <sub>2-3</sub> -T.CATE
XIII	TycB <sub>3</sub> -CATE
XIV	TycB <sub>3</sub> -ATE
XV	TycC <sub>1</sub> -CAT
XVI	TycC <sub>1</sub> -CAT/Te
XVII	TycA-AT-TycB <sub>3</sub> -E
XVIII	TycB <sub>1</sub> -A/TE
XIX	TycC <sub>3</sub> -A/TE
XX	TycC <sub>5</sub> -A/TE
XXI	TycB <sub>2</sub> -AT/E-DSI
XXII	TycB <sub>2</sub> -AT/E-DSI-del
XXIII	TycB <sub>2</sub> -AT/E-DSI-ET
XXIV	TycB <sub>2</sub> -AT/E-DSI-ET-del
XXV	TycB <sub>2-3</sub> -AT.CAT/E
XXVI	TycB <sub>1</sub> -CAT
XXVII	TycB <sub>1</sub> -CAT/Te
XXVIII	TycA-E
XXIX	TycB <sub>3</sub> -E

In dieser Arbeit wurden 33 rekombinante Proteine verwendet. Um diese leichter zuordnen zu können, wurden sie mit römischen Ziffern nummeriert. Der Einfachheit halber wurde im laufenden Text teilweise nur diese Nummer erwähnt. Das zugehörige Protein ist in der Regel aus dem Zusammenhang ersichtlich, kann aber auch hier nachgeschlagen werden. Die in dieser Arbeit verwendete Nomenklatur ist wie folgt: Die Namen beginnen immer mit der Abkürzung des Operons, dem die für diese Proteine kodierende DNA entnommen wurde



(Tyc, Tyrocidin; Grs, Gramicidin S, Bac, Bacitracin). Dieses Kürzel wird gefolgt von der Bezeichnung des jeweiligen Moduls des Operons. Daran schließt sich die Domänenzusammensetzung an. Eine Grenze zwischen zwei Modulen wurde hierbei mit einem „,“, eine Fusionsstelle mit einem „/“ gekennzeichnet. Wenn nicht gesondert angegeben handelt es sich bei den E- oder TE-Fusionen immer um die entsprechenden Domänen aus TycA. Bei den Te-Fusionen fand ausschließlich die Te-Domäne aus TycC<sub>6</sub> Verwendung. Um die Nomenklatur zu veranschaulichen, soll ein Beispiel gegeben werden: TycB<sub>2-3</sub>-AT.CAT/E (XXV) bezeichnet ein Protein, welches aus dem zweiten und dritten Modul der Tyrocidin Synthetase B entstammt. Die AT-Domänen sind TycB<sub>2</sub> zuzuordnen, die CAT-Domänen TycB<sub>3</sub>. Am C-Terminus des letzten PCP's befindet sich die fusionierte E-Domäne von TycA. Gesondert zu betrachten sind die Enzyme VII, VIII, IX, X, XXI, XXII, XXIII und XXIV. Bei den ersten vier Enzymen handelt es sich um CoreT-Mutanten von GrsA-ATE (VI), bei den letzten vier Proteinen um PCP-Mutanten von TycB<sub>2</sub>-AT/E (Ib). Die Kürzel, die sich an den Proteinamen anschließen, geben hier die Art der Mutationen an. In Zusammenhang mit diesen Mutanten wird GrsA-ATE (VI) als „wildtyp“-Enzym bezeichnet, wobei zu beachten ist, dass es nicht aus dem natürlichen Produzenten *B. brevis*, sondern rekombinant aus dem heterologen Wirt *E. coli* als eine His<sub>6</sub>-tag Fusion aufgereinigt wurde.

Eine Besonderheit bei der Nomenklatur kommt den PCPs zu. Die Bezeichnung PCP wird aufgrund der Analogie zu ACPs aus Fettsäure- und Polyketidsynthasen im laufenden Text verwendet. Bei der Domänenschreibweise oben aufgeführter Proteine hat sich jedoch die „Ein-Buchstabe-eine-Domäne“-Schreibweise als sinnvoll erwiesen, so dass in der gesamten Arbeit hier ausschließlich „T“ anstelle von PCP verwendet wird. Lediglich einige Modifikationsdomänen, wie z.B. die Te-Domänen, besitzen mehr als einen Buchstaben zur Domänenbeschreibung, wobei dann nur der erste Buchstabe groß geschrieben wird.

## Anhang B – Herkunft und Klonierung aller verwendeten Proteine

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Primer zur Amplifikation von benötigten DNA-Fragmenten sind in Tabelle 7-1 zusammengefasst und numeriert (P1-P45). Zur Erzeugung der für die Fusionsproteine kodierenden Plasmide wurden DNA-Bereiche, die für bestimmte Domänen kodieren, teilweise zwischenkloniert. Diese Konstrukte sind anfangs beschrieben und mit K1-K11 numeriert. Danach wird die Herkunft bzw. die Klonierung der Plasmide, die die Gene zur Expression der mit römischen Ziffern numerierten und in Anhang A gezeigten Proteine enthalten, der Reihenfolge nach beschrieben. Für die Amplifikation und Klonierung der DNA-Fragmente wurden Standardmethoden angewandt, so dass darauf nicht näher eingegangen wird. Zur Klonierung der DNA-Fragmente wurde ausschließlich das pQE-Vektorsystem (Vektoren pQE60 und pQE70) der Firma *Qiagen* verwendet.

**Tabelle 7-1 Übersicht über alle verwendeten Primer:** Die Primer sind numeriert mit P1-P45. Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen, die zur Klonierung benötigt wurden, sind fett gedruckt. Teilweise sind in diesen Bereichen Mutationen eingeführt worden um die korrekten Sequenzen zu erhalten. Mutationen, die eingeführt wurden um bewusst Codons zu verändern, sind unterstrichen.

Nr.	Oligonukleotidsequenz
P1	5'-TAAAGATCTGCCTACCATCCTCCG-3'
P2	5'-TATGGATCCGCGCAGTGTATTTGCAAG-3'
P3	5-ATAAGATCTAGAAAAAGCGATCAGGGCATC-3'
P4	5'-AATGCATGCTGACTGCGCATGAG-3'
P5	5'-ATAGGATCCAATCCATTCCAGGATGTTTTCC-3'
P6	5'-AATGCATGCTGACTGCGCATGAG-3'
P7	5'-ATAGGATCCTTCGATCAAGCGGGCCAAGTC-3'
P8	5'-AAAGCATGCTGACAGCAGCAG-3'
P9	5'-AAAGGATCCCCGGTTCTCCTCCTGGTTC-3'
P10	5'-AAAGGATCCCCGGGATGACGCGCAGAG-3'
P11	5'-AATCCATGGTCAGCGAGGAAGAGCG-3'
P12	5'-AAAGGATCCTGTCGTCCGCTCG-3'
P13	5'-AAAGGATCCGGCAATATGCGCAGCCAAC-3'
P14	5'-ATACCATGGTAGCAAATCAGGCCAATC-3'

P15	5'-AAAGGATCCGCTTTGGTTTGCCGTAAG-3'
P16	5'-AAAAGATCTCGAGAGAGCGAGCAGG-3'
P17	5'-ATAGGATCCAATCCATTCCAGGATGTTTTCC-3'
P18	5'-TTTACTAGTAAAAGAAGAAGTGAGCAAGG-3'
P19	5'-ATAGGATCCCGTTAATGAATCGGCCAAC-3'
P20	5-TTTGCATGCCTGCAACAGGAGC-3'
P21	5'-AATGCATGCATAGCGAACAGGCAG-3'
P22	5'-AAAGCATGCTGACAGCAGCAG-3'
P23	5'-ATACCATGGAAAAGCAGGAAAACATCGC-3'
P24	5'-TTTACTAGTAAAAGAAGAAGTGAGCAAGG-3'
P25	5'-GGAAGCGATATGGAACATCC-3'
P26	5'-AAAGGATCCCGAAAGGAAGCGGGCC-3'
P27	5'-CAC CAT CTT GTC GTG GAT GGC GTC-3'
P28	5'-CTATGCATTAGGTGGAGCTTCTATTAAAGCAATACAGGTTGCTGC-3'
P29	5'-GCAGCAACCTGTATTGCTTTAATAGAAGCTCCACCTAATGCATAG-3'
P30	5'-CTATGCATTAGGTGGACATTCTATTAAAGCAATACAGGTTGCTGC-3'
P31	5'-GCAGCAACCTGTATTGCTTTAATAGAATGTCCACCTAATGCATAG-3'
P32	5'-CTATGCATTAGGTGGACATTCTTTAAAGCAATACAGGTTGCTGC-3'
P33	5'-GCAGCAACCTGTATTGCTTTAAGAGAATGTCCACCTAATGCATAG-3'
P34	5'-CTATGCATTAGGTGGAGATTCTTTAAAGCAATACAGGTTGCTGC-3'
P35	5'-GCAGCAACCTGTATTGCTTTAAGAGAATCTCCACCTAATGCATAG-3'
P36	5'-GAGCTGGGCGGTGATTCCATAAAAGCGATGACGGTTGTG-3'
P37	5'-CACAACCGTCATCGCTTTTATGGAATCACCGCCAGCTC-3'
P38	5'-GGCGCAAGTGCATCGCTTCAAATCGACCTTTTGCTGAAGC-3'
P39	5'-GCTTCAGCAAAAGGTCGATTTGAAAGCGATGCACTTGCGCC-3'
P40	5'-CAAATCGACCTTGAGACGAAGCAGTTTTTTGCAGCGCCAACCATCC-3'
P41	5'-GGATGGTTGGCGCTGCAAAAACTGCTTCGTCCTCAAGGTCGATTTG-3'
P42	5'-TATCCATGGTTCCGTTGCTGACAGAAG-3'
P43	5'-TAAGGATCCCGTCTTGGCACTTCCTTC-3'
P44	5'-AATCCATGGTGTCCAAAGCAGAGACG-3'
P45	5'-AAAGGATCCTCTCAGCATGGTGACATC-3'

**Beschreibung der Konstrukte K1-K11:**

**K1) p[tycA-TE]:** Zur Amplifikation dieses DNA-Fragmentes wurde chromosomale DNA von *Bacillus brevis* ATCC 8185 als Templat mit den Primern P1 und P2 verwendet. Die Klonierung erfolgte ungerichtet in einen mit *Bgl*III linearisierten pQE60-Vektor. Die richtige Orientierung des Gens wurde durch Kontrollen mit Restriktionsendonukleasen bestätigt. Zur Erzeugung von Fusionen wurde der Vektor mit *Bgl*III und *Xba*I oder *Nde*I (je nach Kompatibilität) geöffnet und das Insert-enhaltende Fragment in den gewünschten Zielvektor ligiert.

**K2) p[tycA-E]:** Zur Amplifikation dieses DNA-Fragmentes wurde chromosomale DNA von *Bacillus brevis* ATCC 8185 als Templat mit den Primern P2 und P3 verwendet. Die Klonierung erfolgte ungerichtet in einen mit *Bgl*III linearisierten pQE60-Vektor. Die richtige Orientierung des Gens wurde durch Kontrollen mit Restriktionsendonukleasen bestätigt. Zur Erzeugung von Fusionen wurde der Vektor mit *Bgl*III und *Xba*I oder *Nde*I (je nach Kompatibilität) geöffnet und das Insert-enhaltende Fragment in den gewünschten Zielvektor ligiert.

**K3) p[tycB<sub>3</sub>-E]:** Zur Amplifikation dieses DNA-Fragmentes wurde chromosomale DNA von *Bacillus brevis* ATCC 8185 als Templat mit den Primern P16 und P17 verwendet. Die Klonierung erfolgte ungerichtet in einen mit *Bgl*III linearisierten pQE60-Vektor. Die richtige Orientierung des Gens wurde durch Kontrollen mit Restriktionsendonukleasen bestätigt. Zur Erzeugung von Fusionen wurde der Vektor mit *Bgl*III und *Xba*I oder *Nde*I (je nach Kompatibilität) geöffnet und das Insert-enhaltende Fragment in den gewünschten Zielvektor ligiert.

**K4) p[tycA-AT]:** Zur Amplifikation dieses DNA-Fragmentes wurde chromosomale DNA von *Bacillus brevis* ATCC 8185 als Templat mit den Primern P14 und P15 verwendet. Die Klonierung erfolgte über *Nco*I und *Bam*HI.

**K5) p[tycB<sub>2</sub>-AT]:** Zur Amplifikation dieses DNA-Fragmentes wurde chromosomale DNA von *Bacillus brevis* ATCC 8185 als Templat mit den Primern P6 und P7 verwendet. Die Klonierung erfolgte über *Sph*I und *Bam*HI.

**K6) p[tycB<sub>3</sub>-A]:** Zur Amplifikation dieses DNA-Fragmentes wurde chromosomale DNA von *Bacillus brevis* ATCC 8185 als Templat mit den Primern P8 und P9 verwendet. Die Klonierung erfolgte über *SphI* und *BamHI*.

**K7) p[tycB<sub>3</sub>-AT]:** Zur Amplifikation dieses DNA-Fragmentes wurde chromosomale DNA von *Bacillus brevis* ATCC 8185 als Templat mit den Primern P8 und P10 verwendet. Die Klonierung erfolgte über *SphII* und *BamHI*.

**K8) p[tycC<sub>4</sub>-A]:** Zur Amplifikation dieses DNA-Fragmentes wurde chromosomale DNA von *Bacillus brevis* ATCC 8185 als Templat mit den Primern P11 und P12 verwendet. Die Klonierung erfolgte über *NcoI* und *BamHI*.

**K9) p[tycC<sub>4</sub>-AT]:** Zur Amplifikation dieses DNA-Fragmentes wurde chromosomale DNA von *Bacillus brevis* ATCC 8185 als Templat mit den Primern P11 und P13 verwendet. Die Klonierung erfolgte über *NcoI* und *BamHI*.

**K10) p[tycB<sub>1</sub>-A]:** Zur Amplifikation dieses DNA-Fragmentes wurde chromosomale DNA von *Bacillus brevis* ATCC 8185 als Templat mit den Primern P42 und P43 verwendet. Die Klonierung erfolgte über *NcoI* und *BamHI*.

**K11) p[tycC<sub>5</sub>-A]:** Zur Amplifikation dieses DNA-Fragmentes wurde chromosomale DNA von *Bacillus brevis* ATCC 8185 als Templat mit den Primern P44 und P45 verwendet. Die Klonierung erfolgte über *NcoI* und *BamHI*.

***Beschreibung der Plasmide, die für die in dieser Arbeit erwähnten Proteine kodieren***

**Ia) p[TycB<sub>2</sub>-A/TE]:** Die Klonierung wurde bereits von *Sascha Dökel* beschrieben [164].

**Ib) p[TycB<sub>2</sub>-AT/E]:** Das DNA-Fragment K2 wurde in das mit den Restriktionsendonukleasen *BamHI* und *XbaI* modifizierte Plasmid K5 ligiert.

**IIa) p[TycB<sub>3</sub>-A/TE]:** Das DNA-Fragment K1 wurde in das mit den Restriktionsendonukleasen *BamHI* und *XbaI* modifizierte Plasmid K6 ligiert.

**IIb) p[TycB<sub>3</sub>-AT/E]:** Das DNA-Fragment K2 wurde in das mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Xba*I modifizierte Plasmid K7 ligiert.

**IIIa) p[TycC<sub>4</sub>-A/TE]:** Das DNA-Fragment K1 wurde in das mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Xba*I modifizierte Plasmid K8 ligiert.

**IIIb) p[TycC<sub>4</sub>-AT/E]:** Das DNA-Fragment K2 wurde in das mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Nde*I modifizierte Plasmid K9 ligiert.

**IVa) p[BacA<sub>1</sub>-A/TE]:** Die Klonierung wurde bereits von *Sascha Dökel* beschrieben [164].

**IVb) p[BacA<sub>1</sub>-AT/E]:** Das Fragment *grsA*-E wurde durch Amplifikation chromosomaler DNA von *Bacillus brevis* ATCC 9999 mit den Primern P18 und P19 erhalten. Danach wurde es mit *Spe*I und *Bam*HI modifiziert. Die Ligation dieses Fragmentes erfolgte in einen mit *Spe*I und *Bgl*II modifizierten Vektor, der zuvor durch die Amplifikation des Plasmides pQE-*bacA*<sub>1</sub>-<sub>2</sub>-AT.CyAT [16] mit den Primern P24 und P25 erhalten worden war.

**V) p[TycA-ATE]:** Die Klonierung wurde von *Henning Mootz* beschrieben [89].

**VI) p[GrsA-ATE]:** Die Klonierung wurde von *Stachelhaus et al.* beschrieben [52].

**VII) p[GrsA-ASI]:** Diese Mutante ist ein Derivat von p[GrsA-ATE] (VI) und wurde mit Hilfe des Quick Change Site Directed Mutagenesis Kit (*Stratagene*) erzeugt. Es wurden die Primer P28 und P29 verwendet.

**VIII) p[GrsA-HSI]:** Diese Mutante ist ein Derivat von p[GrsA-ATE] (VI) und wurde mit Hilfe des Quick Change Site Directed Mutagenesis Kit (*Stratagene*) erzeugt. Es wurden die Primer P30 und P31 verwendet.

**IX) p[GrsA-HSL]:** Diese Mutante ist ein Derivat von p[GrsA-ATE] (VI) und wurde mit Hilfe des Quick Change Site Directed Mutagenesis Kit (*Stratagene*) erzeugt. Es wurden die Primer P32 und P33 verwendet.

**X) p[GrsA-DSL]:** Diese Mutante ist ein Derivat von p[GrsA-ATE] (VI) und wurde mit Hilfe des Quick Change Site Directed Mutagenesis Kit (*Stratagene*) erzeugt. Es wurden die Primer P34 und P35 verwendet.

**XI) p[TycB<sub>2-3</sub>-AT.CATE]:** Zur Amplifikation des DNA-Fragmentes wurde chromosomale DNA von *Bacillus brevis* ATCC 8185 als Templat mit den Primern P4 und P5 verwendet. Die Klonierung erfolgte über *SphI* und *BamHI* in einen pQE70 Vektor.

**XII) p[TycB<sub>2-3</sub>-T.CATE]:** Zur Amplifikation des DNA-Fragmentes wurde chromosomale DNA von *Bacillus brevis* ATCC 8185 als Templat mit den Primern P20 und P5 verwendet. Die Klonierung erfolgte über *SphI* und *BamHI* in einen pQE70 Vektor.

**XIII) p[TycB<sub>3</sub>-CATE]:** Zur Amplifikation des DNA-Fragmentes wurde chromosomale DNA von *Bacillus brevis* ATCC 8185 als Templat mit den Primern P21 und P5 verwendet. Die Klonierung erfolgte über *SphI* und *BamHI* in einen pQE70 Vektor.

**XIV) p[TycB<sub>3</sub>-ATE]:** Zur Amplifikation des DNA-Fragmentes wurde chromosomale DNA von *Bacillus brevis* ATCC 8185 als Templat mit den Primern P22 und P5 verwendet. Die Klonierung erfolgte über *SphI* und *BamHI* in einen pQE70 Vektor.

**XV) p[TycC<sub>1</sub>-CAT]:** Zur Amplifikation des DNA-Fragmentes wurde chromosomale DNA von *Bacillus brevis* ATCC 8185 als Templat mit den Primern P23 und P26 verwendet. Die Klonierung erfolgte über *NcoI* und *BamHI* in einen pQE60 Vektor.

**XVI) p[TycC<sub>1</sub>-CAT/Te]:** Das durch Modifikation des Plasmides pQE60-tycC6-Te mit *BglII* und *NdeI* erhaltene Insert wurde in p[TycC<sub>1</sub>-CAT] (XV) ligiert, welches zuvor mit *BamHI* und *NdeI* modifiziert worden war.

**XVII) p[TycA-AT-TycB<sub>3</sub>-E]:** Das DNA-Fragment K3 wurde in das mit den Restriktionsendonukleasen *BamHI* und *XbaI* modifizierte Plasmid K4 ligiert.

**XVIII) p[TycB<sub>1</sub>-A/TE]:** Das DNA-Fragment K1 wurde in das mit den Restriktionsendonukleasen *BamHI* und *NdeI* modifizierte Plasmid K10 ligiert.

**XIX) p[TycC<sub>3</sub>-A/TE]:** Die Klonierung wurde von *Sascha Dökel* beschrieben [164].

**XX) p[TycC<sub>5</sub>-A/TE]:** Das DNA-Fragment K1 wurde in das mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Nde*I modifizierte Plasmid K11 ligiert.

**XXI) p[TycB<sub>2</sub>-A/TE-DSI]:** Diese Mutante ist ein Derivat von p[TycB<sub>2</sub>-A/TE] (Ib) und wurde mit Hilfe des Quick Change Site Directed Mutagenesis Kit (*Stratagene*) erzeugt. Es wurden die Primer P3'6 und P37 verwendet.

**XXII) p[TycB<sub>2</sub>-A/TE-DSI-del]:** Diese Mutante ist ein Derivat von p[TycB<sub>2</sub>-A/TE-DSI] (XXI) und wurde mit Hilfe des Quick Change Site Directed Mutagenesis Kit (*Stratagene*) erzeugt. Es wurden die Primer P38 und P39 verwendet.

**XXIII) p[TycB<sub>2</sub>-A/TE-DSI-ET]:** Diese Mutante ist ein Derivat von p[TycB<sub>2</sub>-A/TE-DSI] (XXI) und wurde mit Hilfe des Quick Change Site Directed Mutagenesis Kit (*Stratagene*) erzeugt. Es wurden die Primer P40 und P41 verwendet.

**XXIV) p[TycB<sub>2</sub>-A/TE-DSI-del-ET]:** Diese Mutante ist ein Derivat von p[TycB<sub>2</sub>-A/TE-DSI-del] (XXII) und wurde mit Hilfe des Quick Change Site Directed Mutagenesis Kit (*Stratagene*) erzeugt. Es wurden die Primer P40 und P41 verwendet.

**XXV) p[TycB<sub>2-3</sub>-AT.CAT/E]:** Mit dem Plasmid p[TycB<sub>2-3</sub>-AT.CATE] (XI) als Templat und den Primern P10 und P27 wurde eine PCR durchgeführt. Nach der Modifikation des PCR-Amplifikates mit *Bam*HI und *Nde*I wurde dieses mit dem Fragment K3 ligiert.

**XXVI) p[TycB<sub>1</sub>-CAT]:** Die Klonierung wurde beschrieben von *Mootz et al.* [89].

**XXVII) p[TycB<sub>1</sub>-CAT-Te]:** Die Klonierung wurde beschrieben von *Dirk Schwarzer* [91].

**XXVIII) p[TycA-E]:** Die Klonierung ist beschrieben bei K1.

**XXIX) p[TycB<sub>3</sub>-E]:** Die Klonierung ist beschrieben bei K3.



## Anhang C – Core-Sequenzen von NRPS-Domänen

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

## Anhang D – Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1: Beispiele für die strukturelle Vielfalt von Produkten der nichtribosomalen Peptidsynthese	6
Abbildung 2-2 (vorherige Seite): Schematische Darstellung der für einige Peptidsynthetasen kodierenden Gene	10
Abbildung 2-3: Nichtribosomale Peptidsynthese schematisch dargestellt am Beispiel der Tyrocidin Synthetasen	11
Abbildung 2-4: Die wichtigsten Domänen von Peptidsynthetase-Modulen	12
Abbildung 2-5: Reversible Aktivierung der Substrataminosäuren	13
Abbildung 2-6: Das Peptidyl-Carrier-Protein (PCP)	14
Abbildung 2-7: Die enzymatische Funktion der 4'-Ppant-Transferasen	15
Abbildung 2-8: Die katalytische Funktion der C-Domäne	16
Abbildung 2-9: DKP-Bildung durch die Enzyme GrsA/TycA und TycB1-CAT	17
Abbildung 2-10: Die katalytische Funktion der Cy-Domäne	18
Abbildung 2-11: Die katalytische Funktion der Te-Domäne	19
Abbildung 2-12: Bildung von Thiazol- und Thiazolidin-Strukturen	21
Abbildung 2-13: Mechanismus einer PLP-abhängigen Racemase	22
Abbildung 2-14: Diskutierte alternative E-Domänen Mechanismen und der mechanistische Vergleich zu C-Domänen	23
Abbildung 5-1: Reaktionen eines A-PCP-E Moduls	45
Abbildung 5-2: Übersicht über die Herkunft der DNA-Konstrukte und die Art der Fusionen	46
Abbildung 5-3: Relative ATP-PP <sub>i</sub> -Austauschaktivität	48
Abbildung 5-4: Aminoacylierungskinetiken der Fusionsproteine	50
Abbildung 5-5: Produktanalyse des Epimerisierungsassays von IVa	52
Abbildung 5-6: Epimerisierungskinetiken der Fusionsproteine	53
Abbildung 5-7: Vergleich der L-zu-D Umwandlung in den Phe-S-Ppant Komplexen der Proteine IIb, V, XIV und XVII	55
Abbildung 5-8 (vorherige Seite): Sequenzvergleich von PCP <sup>C</sup> s mit PCP <sup>E</sup> s	58
Abbildung 5-9: GrsA-CoreT-Mutanten	59
Abbildung 5-10: Epimerisierungskinetiken der GrsA-CoreT Mutanten XII, XIII, IX und X	60
Abbildung 5-11 Mutanten des Fusionsproteins TycB <sub>2</sub> -AT/E (Ib)	62

Abbildung 5-12: Epimerisierungskinetiken der TycB <sub>2</sub> -AT/E-Mutanten XXI, XXII, XXIII und XXIV	63
Abbildung 5-13: Übersicht über die Herkunft der Enzyme für das entwickelte <i>in vitro</i> System	64
Abbildung 5-14: Relative ATP-PP <sub>i</sub> -Austauschaktivität der NRPS-Module XI, XII, XIII, XIV, XV und XVI	65
Abb. 5-15: Aminoacylierungs- und Transferkinetiken der TycB <sub>3</sub> Derivate	67
Abbildung 5-16: Produktbildungsaktivitäten der TycB <sub>3</sub> -Derivate XI, XII, XIII und XIV analysiert durch HPLC-MS (detektierter Massenbereich: 100-600 Da)	70
Abbildung 5-17: Epimerisierungskinetiken der TycB-Derivate	72
Abbildung 5-18: Autoradiographie der DC-Analyse des Epimerisierungsassays von TycB <sub>2-3</sub> -AT.CAT/E (XXV) mit [ <sup>14</sup> C]-L-Phe als Substrat	74
Abbildung 6-1: Pantethein und N-Acetylcysteamin	78
Abbildung 6-2: Modell für die Rolle einer N-terminalen C-Domäne bei der Verhinderung interner Mis-Initiation sowie für ihren Einfluss auf den Zeitpunkt der Epimerisierung	90
Abbildung 6-3: Aminoacyl- versus peptidyl-S-Ppant Epimerisierung	95

## 8 Literaturverzeichnis

- 1) **Marahiel, M.A., Stachelhaus, T. & Mootz, H.D.** (1997) Modular peptide synthetases involved in non-ribosomal peptide synthesis, *Chem. Rev.* **97**, 2651-2673.
- 2) **Schwarzer, D. & Marahiel, M.A.** (2001) Multimodular biocatalysts for natural product assembly, *Naturwissenschaften.* **88**, 93-101.
- 3) **Konz, D. & Marahiel, M.A.** (1999) How do peptide synthetases generate structural diversity?, *Chem Biol.* **6**, R39-48.
- 4) **van Wageningen, A., Kirkpatrick, P., Williams, D., Harris, B., Kershaw, J., Lennard, N., Jones, M., Jones, S. & Solenberg, P.** (1998) Sequencing and analysis of genes involved in the biosynthesis of a vancomycin group antibiotic, *Chem. Biol.* **5**, 155-162.
- 5) **Marahiel, M.A.** (1997) Protein templates for the biosynthesis of peptide antibiotics, *Chem Biol.* **4**, 561-7.
- 6) **von Döhren, H., Keller, U., Vater, J. & Zocher, R.** (1997) Multifunctional Peptide Synthetases, *Chem. Rev.* **97**, 2675-2705.
- 7) **Kleinkauf, H. & von Dohren, H.** (1990) Antibiotics-cloning of biosynthetic pathways, *FEBS Lett.* **268**, 405-7.
- 8) **Kleinkauf, H. & von Döhren, H.** (1996) A nonribosomal system of peptide biosynthesis, *Eur. J. Biochem.* **236**, 335-351.
- 9) **Zuber, P., Nakano, M.M. & Marahiel, M.A.** (1993) Peptide antibiotics in *Bacillus subtilis* and other Gram-positive bacteria (Sonnenschein, A. L., Hoch, J. A. & Losick, R., eds) pp. 897-916, Am. Soc. Microbiol., Washington, DC.
- 10) **Zocher, R. & Keller, U.** (1997) Thiol template peptide synthesis systems in bacteria and fungi, *Adv Microb Physiol.* **38**, 85-131.
- 11) **Aharonowitz, Y., Cohen, G. & Martin, J.F.** (1992) Penicillin and cephalosporin biosynthetic genes: structure, organization, regulation, and evolution, *Annu Rev Microbiol.* **46**, 461-95.
- 12) **Schwecke, T., Aharonowitz, Y., Palissa, H., von Dohren, H., Kleinkauf, H. & van Liempt, H.** (1992) Enzymatic characterisation of the multifunctional enzyme delta-(L-alpha- aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine synthetase from *Streptomyces clavuligerus*, *Eur J Biochem.* **205**, 687-94.

- 13) **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**, 2743-50.
- 14) **Gutierrez, S., Diez, B., Montenegro, E. & Martin, J.F.** (1991) Characterization of the *Cephalosporium acremonium* pcbAB gene encoding alpha-aminoadipyl-cysteinyl-valine synthetase, a large multidomain peptide synthetase: linkage to the pcbC gene as a cluster of early cephalosporin biosynthetic genes and evidence of multiple functional domains, *J Bacteriol.* **173**, 2354-65.
- 15) **Mootz, H.D. & Marahiel, M.A.** (1997) The tyrocidine biosynthesis operon of *Bacillus brevis*: complete nucleotide sequence and biochemical characterization of functional internal adenylation domains, *J Bacteriol.* **179**, 6843-50.
- 16) **Konz, D., Klens, A., Schorgendorfer, 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**, 927-37.
- 17) **Ullrich, C., Kluge, B., Palacz, Z. & Vater, J.** (1991) Cell-free biosynthesis of surfactin, a cyclic lipopeptide produced by *Bacillus subtilis*, *Biochemistry.* **30**, 6503-8.
- 18) **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**, 821-31.
- 19) **Lawen, A. & Zocher, R.** (1990) Cyclosporin synthetase. The most complex peptide synthesizing multienzyme polypeptide so far described, *J Biol Chem.* **265**, 11355-60.
- 20) **Gehring, A.M., Mori, I., Perry, R.D. & Walsh, C.T.** (1998) The nonribosomal peptide synthetase HMWP2 forms a thiazoline ring during biogenesis of Yersiniabactin, an iron-chelating virulence factor of *Yersinia pestis*, *Biochemistry.*
- 21) **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**, 26044-9.
- 22) **Nikolskaya, A.N., Panaccione, D.G. & Walton, J.D.** (1995) Identification of peptide synthetase-encoding genes from filamentous fungi producing host-selective phytotoxins or analogs, *Gene.* **165**, 207-11.

- 23) **Nishizawa, T., Ueda, A., Asayama, M., Fujii, K., Harada, K., Ochi, K. & Shirai, M.** (2000) Polyketide Synthase Gene Coupled to the Peptide Synthetase Module Involved in the Biosynthesis of the Cyclic Heptapeptide Microcystin, *J Biochem (Tokyo)*. **127**, 779-789.
- 24) **Carmichael, W.W.** (1994) The toxins of cyanobacteria, *Sci Am*. **270**, 78-86.
- 25) **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.
- 26) **Katz, L. & Donadio, S.** (1993) Polyketide Synthesis: prospects for hybrid antibiotics, *Annu. Rev. Microbiol.* **47**, 875-912.
- 27) **Molnar, I., Schupp, T., Ono, M., Zirkle, R., Milnamow, M., Nowak-Thompson, B., Engel, N., Toupet, C., Stratmann, A., Cyr, D.D., Gorlach, J., Mayo, J.M., Hu, A., Goff, S., Schmid, J. & Ligon, J.M.** (2000) The biosynthetic gene cluster for the microtubule-stabilizing agents epothilones A and B from *Sorangium cellulosum* So ce90, *Chem Biol*. **7**, 97-109.
- 28) **Du, L., Sanchez, C., Chen, M., Edwards, D.J. & Shen, B.** (2000) The biosynthetic gene cluster for the antitumor drug bleomycin from *Streptomyces verticillus* ATCC15003 supporting functional interactions between nonribosomal peptide synthetases and a polyketide synthase, *Chem Biol*. **7**, 623-42.
- 29) **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**, 133-41.
- 30) **Nishizawa, T., Asayama, M., Fujii, K., Harada, K. & Shirai, M.** (1999) Genetic analysis of the peptide synthetase genes for a cyclic heptapeptide microcystin in *Microcystis* spp, .
- 31) **Rohrlack, T., Dittmann, E., Henning, M., Borner, T. & Kohl, J.G.** (1999) Role of microcystins in poisoning and food ingestion inhibition of *Daphnia galeata* caused by the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*, *Appl Environ Microbiol*. **65**, 737-9.
- 32) **Marahiel, M.A. & von Döhren, H.** (1982) *A survey of possible functions of peptide antibiotics in the producer organism*, , Walter de Gruyter, Berlin, Germany.
- 33) **Davies, J.** (1990) What are antibiotics ? Archaic functions of modern activities, *Mol. Microbiol*. **4**, 1227-1232.

- 34) **Marahiel, M.A., Nakano, M.M. & Zuber, P.** (1993) Regulation of peptide antibiotic production in *Bacillus*, *Mol Microbiol.* **7**, 631-6.
- 35) **Solomon, J.M., Magnuson, R., Srivastava, A. & Grossman, A.D.** (1995) Convergent sensing pathways mediate response to two extracellular competence factors in *Bacillus subtilis*, *Genes Dev.* **9**, 547-58.
- 36) **Crosa, J.H.** (1989) Genetics and molecular biology of siderophore-mediated iron transport in bacteria, *Microbiol Rev.* **53**, 517-30.
- 37) **Braun, V. & Killmann, H.** (1999) Bacterial solution to the iron-supply problem, *Trend Biochem. Sci.* **24**, 104-109.
- 38) **Pelludat, C., Rakin, A., Jacobi, C., Schubert, S. & Heesemann, J.** (1998) The yersiniabactin biosynthetic gene cluster of *Yersinia enterocolitica*: organization and siderophore-dependent regulation, *J. Bacteriol.* **180**, 538-546.
- 39) **Bearden, S.W., Fetherston, J.D. & Perry, R.D.** (1997) Genetic organization of the yersiniabactin biosynthetic region and construction of avirulent mutants in *Yersinia pestis*, *Infect. Immun.* **65**, 1659-68.
- 40) **Wyckoff, E.E., Stoebner, J.A., Reed, K.E. & Payne, S.M.** (1997) Cloning of a *Vibrio cholerae* vibriobactin gene cluster: Identification of gene required for early steps in siderophore biosynthesis, *J. Bacteriol.* **179**, 7055-7061.
- 41) **Butterton, J.R., Choi, M.H., Watnick, P.I., Carroll, P.A. & Calderwood, S.B.** (2000) *Vibrio cholerae* VibF is required for vibriobactin synthesis and is a member of the family of nonribosomal peptide synthetases, *J Bacteriol.* **182**, 1731-8.
- 42) **Keating, T.A., Marshall, C.G. & Walsh, C.T.** (2000) Reconstitution and characterization of the *Vibrio cholerae* vibriobactin synthetase from VibB, VibE, VibF, and VibH, *Biochemistry.* **39**, 15522-30.
- 43) **Wyckoff, E.E., Smith, S.L. & Payne, S.M.** (2001) VibD and VibH are required for late steps in vibriobactin biosynthesis in *Vibrio cholerae*, *J Bacteriol.* **183**, 1830-4.
- 44) **Quadri, L.E., Sello, J., Keating, T.A., Weinreb, P.H. & Walsh, C.T.** (1998) Identification of a *Mycobacterium tuberculosis* gene cluster encoding the biosynthetic enzymes for assembly of the virulence-conferring siderophore mycobactin, *Chem Biol.* **5**, 631-45.
- 45) **De Voss, J.J., Rutter, K., Schroeder, B.G., Su, H., Zhu, Y. & Barry, C.E., 3rd.** (2000) The salicylate-derived mycobactin siderophores of *Mycobacterium tuberculosis* are essential for growth in macrophages, *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**, 1252-7.

- 46) **Cane, D.E. & Walsh, C.T.** (1999) The parallel and convergent universes of polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases, *Chem Biol.* **6**, R319-25.
- 47) **Dieckmann, R., Lee, Y.O., van Liempt, H., von Dohren, H. & Kleinkauf, H.** (1995) Expression of an active adenylate-forming domain of peptide synthetases corresponding to acyl-CoA-synthetases, *FEBS Lett.* **357**, 212-6.
- 48) **Stachelhaus, T. & Marahiel, M.A.** (1995) Modular structure of peptide synthetases revealed by dissection of the multifunctional enzyme GrsA, *J Biol Chem.* **270**, 6163-9.
- 49) **Stachelhaus, T., Hüser, A. & Marahiel, M.A.** (1996) Biochemical characterization of peptidyl carrier protein (PCP), the thiolation domain of multifunctional peptide synthetases, *Chem. Biol.* **3**, 913-921.
- 50) **Weber, T., Baumgartner, R., Renner, C., Marahiel, M.A. & Holak, T.A.** (2000) Solution structure of PCP, a prototype for the peptidyl carrier domains of modular peptide synthetases, *Structure Fold Des.* **8**, 407-18.
- 51) **Stein, T., Vater, J., Kruft, 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**, 15428-35.
- 52) **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**, 22773-81.
- 53) **Duitman, E.H., Hamoen, L.W., Rembold, M., Venema, G., Seitz, H., Saenger, W., Bernhard, F., Reinhardt, R., Schmidt, M., Ullrich, C., Stein, T., Leenders, F. & Vater, J.** (1999) The mycosubtilin synthetase of *Bacillus subtilis* ATCC6633: a multifunctional hybrid between a peptide synthetase, an amino transferase, and a fatty acid synthase, *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**, 13294-9.
- 54) **Billman-Jacobe, H., McConville, M.J., Haites, R.E., Kovacevic, S. & Coppel, R.L.** (1999) Identification of a peptide synthetase involved in the biosynthesis of glycopeptidolipids of *Mycobacterium smegmatis*, *Mol Microbiol.* **33**, 1244-53.
- 55) **Guenzi, E., Galli, G., Grgurina, I., Gross, D.C. & Grandi, G.** (1998) Characterization of the syringomycin synthetase gene cluster. A link between prokaryotic and eukaryotic peptide synthetases, *J Biol Chem.* **273**, 32857-63.



- 56) **Linne, U. & Marahiel, M.A.** (2000) Control of directionality in nonribosomal peptide synthesis: role of the condensation domain in preventing misinitiation and timing of epimerization, *Biochemistry*. **39**, 10439-47.
- 57) **Stachelhaus, T. & Walsh, C.T.** (2000) Mutational analysis of the epimerization domain in the initiation module PheATE of gramicidin S synthetase, *Biochemistry*. **39**, 5775-87.
- 58) **Gokhale, R.S., Tsuji, S.Y., Cane, D.E. & Khosla, C.** (1999) Dissecting and exploiting intermodular communication in polyketide synthases, *Science*. **284**, 482-5.
- 59) **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**, 529-46.
- 60) **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.
- 61) **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**, 4174-83.
- 62) **Conti, E., Franks, N.P. & Brick, P.** (1996) Crystal structure of firefly luciferase throws light on a superfamily of adenylate-forming enzymes, *Structure*. **4**, 287-98.
- 63) **Stachelhaus, T., Mootz, H.D. & Marahiel, M.A.** (1999) The specificity-conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases, *Chem Biol*. **6**, 493-505.
- 64) **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.
- 65) **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**, 2654-62.
- 66) **Lipmann, F.** (1980) Bacterial production of antibiotic polypeptides by thiol-linked synthesis on protein templates, *Adv. Microb. Physiol*. **21**, 227-66.
- 67) **Rawlings, M. & Cronan, J.E., Jr.** (1992) The gene encoding *Escherichia coli* acyl carrier protein lies within a cluster of fatty acid biosynthetic genes, *J. Biol. Chem*. **267**, 5751-5754.

- 68) **Sherman, D.H., Malpartida, F., Bibb, M.J., Kieser, H.M., Bibb, M.J. & Hopwood, D.A.** (1989) Structure and deduced function of the granaticin-producing polyketide synthase gene cluster of *Streptomyces violaceoruber* Tu22, *EMBO J.* **8**, 2717-2125.
- 69) **Perham, R.N.** (1991) Domains, motifs, and linkers in 2-oxo acid dehydrogenase multienzyme complexes: a paradigm in the design of a multifunctional protein, *Biochemistry.* **30**, 8501-12.
- 70) **Kim, J.J., Wang, M. & Paschke, R.** (1993) Crystal structures of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase from pig liver mitochondria with and without substrate, *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90**, 7523-7.
- 71) **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**, 313-21.
- 72) **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.
- 73) **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**, 923-36.
- 74) **Reuter, K., Mofid, M.R., Marahiel, M.A. & Ficner, R.** (1999) Crystal structure of the surfactin synthetase-activating enzyme *Sfp*: a prototype of the 4'-phosphopantetheinyl transferase superfamily, *Embo J.* **18**, 6823-6831.
- 75) **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**, 1575-84.
- 76) **Quadri, L.E., Weinreb, P.H., Lei, M., Nakano, M.M., Zuber, P. & Walsh, C.T.** (1998) Characterization of *Sfp*, a *Bacillus subtilis* phosphopantetheinyl transferase for peptidyl carrier protein domains in peptide synthetases, *Biochemistry.* **37**, 1585-95.
- 77) **Suo, Z., Tseng, C.C. & Walsh, C.T.** (2001) Purification, priming, and catalytic acylation of carrier protein domains in the polyketide synthase and nonribosomal peptidyl synthetase modules of the HMWP1 subunit of yersiniabactin synthetase, *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**, 99-104.
- 78) **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.

- 79) **Heath, R.J. & Rock, C.O.** (1998) A conserved histidine is essential for glycerolipid acyltransferase catalysis, *J Bacteriol.* **180**, 1425-30.
- 80) **De Crecy-Lagard, V., Marliere, 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**, 927-36.
- 81) **Bergendahl, V., Linne, U. & Marahiel, M.A.** (2001) Mutational analysis of the condensation domain, *submitted*.
- 82) **Gehring, A.M., Mori, I., Perry, R.D. & Walsh, C.T.** (1998) The nonribosomal peptide synthetase HMWP2 forms a thiazoline ring during biogenesis of yersiniabactin, an iron-chelating virulence factor of *Yersinia pestis* [published erratum appears in *Biochemistry* 1998 Dec 1;37(48):17104], *Biochemistry.* **37**, 11637-50.
- 83) **Keating, T.A. & Walsh, C.T.** (1999) Initiation, elongation, and termination strategies in polyketide and polypeptide antibiotic biosynthesis, *Curr Opin Chem Biol.* **3**, 598-606.
- 84) **Li, Y.M., Milne, J.C., Madison, L.L., Kolter, R. & Walsh, C.T.** (1996) From peptide precursors to oxazole and thiazole-containing peptide antibiotics: microcin B17 synthase [see comments], *Science.* **274**, 1188-93.
- 85) **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**, 404-10.
- 86) **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.
- 87) **May, J.J., Wendrich, T.M. & Marahiel, M.A.** (2001) The *dhb* operon of *Bacillus subtilis* encodes the biosynthetic template for the catecholic siderophore 2,3-dihydroxybenzoate-glycine-threonine trimeric ester bacillibactin, *J Biol Chem.* **276**, 7209-17.
- 88) **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**, 25304-9.

- 89) **Mootz, H.D., Schwarzer, D. & Marahiel, M.A.** (2000) Construction of hybrid peptide synthetases by module and domain fusions, *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**, 5848-53.
- 90) **Doekel, S. & Marahiel, M.A.** (2000) Dipeptide formation on engineered hybrid peptide synthetases, *Chem Biol.* **7**, 373-84.
- 91) **Schwarzer, D., Mootz, H.D. & Marahiel, M.A.** (2001) Exploring the impact of different thioesterase domains for the design of hybrid peptide synthetases, *Chem. Biol.* **in press**.
- 92) **Trauger, J., Kohli, R., Mootz, H., Marahiel, M. & Walsh, C.** (2000) Peptide cyclization catalysed by the thioesterase domain of tyrocidine synthetase., *Nature.* **407**, 215-8.
- 93) **Trauger, J.W., Kohli, R.M. & Walsh, C.T.** (2001) Cyclization of backbone-substituted peptides catalyzed by the thioesterase domain from the tyrocidine nonribosomal peptide synthetase, *Biochemistry.* **40**, 7092-8.
- 94) **Kohli, R.M., Trauger, J.W., Schwarzer, D., Marahiel, M.A. & Walsh, C.T.** (2001) Generality of peptide cyclization catalyzed by isolated thioesterase domains of nonribosomal peptide synthetases, *Biochemistry.* **40**, 7099-108.
- 95) **Weber, T., Bruner, S.D., Kohli, R.M., Schwarzer, D., Marahiel, M.A., Walsh, C.T. & Stubbs, M.T.** (2001) Structural basis for the cyclization of the lipopeptide antibiotic surfactin by the thioesterase domain SrfTe, *Structure.* **submitted**.
- 96) **Schwarzer, D. & Marahiel, M.** (2001) Possible Catalytic function of Te II - unpublished.
- 97) **Casqueiro, J., Gutierrez, S., Banuelos, O., Fierro, F., Velasco, J. & Martin, J.F.** (1998) Characterization of the lys2 gene of *Penicillium chrysogenum* encoding alpha-aminoadipic acid reductase, *Mol Gen Genet.* **259**, 549-56.
- 98) **Ehmann, D.E., Gehring, A.M. & Walsh, C.T.** (1999) Lysine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: mechanism of alpha-aminoadipate reductase (Lys2) involves posttranslational phosphopantetheinylation by Lys5, *Biochemistry.* **38**, 6171-7.
- 99) **Witkowski, A., Witkowska, H.E. & Smith, S.** (1994) Reengineering the specificity of a serine active-site enzyme. Two active-site mutations convert a hydrolase to a transferase, *J Biol Chem.* **269**, 379-83.

- 100) **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**, 4633-42.
- 101) **Stindl, A. & Keller, U.** (1994) Epimerization of the D-valine portion in the biosynthesis of actinomycin D, *Biochemistry*. **33**, 9358-64.
- 102) **Shiau, C.Y., Baldwin, J.E., Byford, M.F., Sobey, W.J. & Schofield, C.J.** (1995) delta-L-(alpha-aminoadipoyl)-L-cysteinyl-D-valine synthetase: the order of peptide bond formation and timing of the epimerisation reaction, *FEBS Lett.* **358**, 97-100.
- 103) **Luo, L. & Walsh, C.T.** (2001) Kinetic analysis of three activated phenylalanyl intermediates generated by the initiation module PheATE of gramicidin S synthetase, *Biochemistry*. **40**, 5329-37.
- 104) **Belshaw, P.J., Walsh, C.T. & Stachelhaus, T.** (1999) Aminoacyl-CoAs as probes of condensation domain selectivity in nonribosomal peptide synthesis, *Science*. **284**, 486-9.
- 105) **de Crecy-Lagard, V., Blanc, V., Gil, P., Naudin, L., Lorenzon, S., Famechon, A., Bamas-Jacques, N., Crouzet, J. & Thibaut, D.** (1997) Pristinamycin I biosynthesis in *Streptomyces pristinaespiralis*: molecular characterization of the first two structural peptide synthetase genes, *J Bacteriol.* **179**, 705-13.
- 106) **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**, 905-14.
- 107) **Billich, A., Zocher, R., Kleinkauf, H., Braun, D.G., Lavanchy, D. & Hochkeppel, H.K.** (1987) Monoclonal antibodies to the multienzyme enniatin synthetase. Production and use in structural studies, *Biol Chem Hoppe Seyler*. **368**, 521-9.
- 108) **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**, 116-22.
- 109) **Pieper, R., Haese, A., Schroder, W. & Zocher, R.** (1995) Arrangement of catalytic sites in the multifunctional enzyme enniatin synthetase, *Eur J Biochem.* **230**, 119-26.
- 110) **Julien, B., Shah, S., Ziermann, R., Goldman, R., Katz, L. & Khosla, C.** (2000) Isolation and characterization of the epothilone biosynthetic gene cluster from *Sorangium cellulosum*, *Gene*. **249**, 153-160.

- 111) **Silakowski, B., Schairer, H.U., Ehret, H., Kunze, B., Weinig, S., Nordsiek, G., Brandt, P., Blocker, H., Hofle, G., Beyer, S. & Muller, R.** (1999) New lessons for combinatorial biosynthesis from myxobacteria. The myxothiazol biosynthetic gene cluster of *Stigmatella aurantiaca* DW4/3-1, *J Biol Chem.* **274**, 37391-9.
- 112) **Quadri, L.E., Keating, T.A., Patel, H.M. & Walsh, C.T.** (1999) Assembly of the *Pseudomonas aeruginosa* nonribosomal peptide siderophore pyochelin: In vitro reconstitution of aryl-4, 2-bisthiazoline synthetase activity from PchD, PchE, and PchF, *Biochemistry.* **38**, 14941-54.
- 113) **Rouhiainen, L., Paulin, L., Suomalainen, S., Hyytiainen, H., Buikema, W., Haselkorn, R. & Sivonen, K.** (2000) Genes encoding synthetases of cyclic depsipeptides, anabaenopeptilides, in *Anabaena* strain 90, *Mol Microbiol.* **37**, 156-67.
- 114) **Akashi, K. & Kurahashi, K.** (1978) Enzyme-bound formylvaline and formylvalylglycine; an initiation complex for gramicidin A biosynthesis, *J Biochem (Tokyo).* **83**, 1219-29.
- 115) **Powers, V.M., Koo, C.W., Kenyon, G.L., Gerlt, J.A. & Kozarich, J.W.** (1991) Mechanism of the reaction catalyzed by mandelate racemase. 1. Chemical and kinetic evidence for a two-base mechanism, *Biochemistry.* **30**, 9255-63.
- 116) **Tanner, M.E. & Kenyon, G.L.** (1998) *Comprehensive Biological Catalysis*, Academic Press, San Diego, CA.
- 117) **Rios & Richard.** (1997) *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 8375-8376.
- 118) **Shaw, Petsko & Ringe.** (1997) *Biochemistry.* **36**, 1329-1342.
- 119) **Faraci, W.S. & Walsh, C.T.** (1988) Racemization of alanine by the alanine racemases from *Salmonella typhimurium* and *Bacillus stearothermophilus*: energetic reaction profiles, *Biochemistry.* **27**, 3267-76.
- 120) **Fisher, L.M., Belasco, J.G., Bruice, T.W., Albery, W.J. & Knowles, J.R.** (1986) Energetics of proline racemase: transition-state fractionation factors for the two protons involved in the catalytic steps, *Biochemistry.* **25**, 2543-51.
- 121) **Cirilli, M., Zheng, R., Scapin, G. & Blanchard, J.S.** (1998) Structural symmetry: the three-dimensional structure of *Haemophilus influenzae* diaminopimelate epimerase, *Biochemistry.* **37**, 16452-8.
- 122) **Higgins, W., Tardif, C., Richaud, C., Krivanek, M.A. & Cardin, A.** (1989) Expression of recombinant diaminopimelate epimerase in *Escherichia coli*. Isolation and inhibition with an irreversible inhibitor, *Eur J Biochem.* **186**, 137-43.

- 123) **Glavas, S. & Tanner, M.E.** (1999) Catalytic acid/base residues of glutamate racemase, *Biochemistry*. **38**, 4106-13.
- 124) **Glavas, S. & Tanner, M.E.** (2001) Active site residues of glutamate racemase, *Biochemistry*. **40**, 6199-204.
- 125) **Gallo, K.A., Tanner, M.E. & Knowles, J.R.** (1993) Mechanism of the reaction catalyzed by glutamate racemase, *Biochemistry*. **32**, 3991-7.
- 126) **Galakatos, N.G. & Walsh, C.T.** (1987) Specific proteolysis of native alanine racemases from *Salmonella typhimurium*: identification of the cleavage site and characterization of the clipped two-domain proteins, *Biochemistry*. **26**, 8475-8480.
- 127) **Pfeifer, E., Pavela-Vrancic, M., von Dohren, H. & Kleinkauf, H.** (1995) Characterization of tyrocidine synthetase 1 (TY1): requirement of posttranslational modification for peptide biosynthesis, *Biochemistry*. **34**, 7450-9.
- 128) **Hoffmann, K., Schneider-Scherzer, E., Kleinkauf, H. & Zocher, R.** (1994) Purification and characterization of eucaryotic alanine racemase acting as key enzyme in cyclosporin biosynthesis, *J Biol Chem*. **269**, 12710-4.
- 129) **Cheng, Y.Q. & Walton, J.D.** (2000) A eukaryotic alanine racemase gene involved in cyclic peptide biosynthesis, *J Biol Chem*. **275**, 4906-11.
- 130) **Mootz, H.D. & Marahiel, M.A.** (1997) Biosynthetic systems for nonribosomal peptide antibiotic assembly, *Curr Opin Chem Biol*. **1**, 543-51.
- 131) **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**, 133-40.
- 132) **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**, 3443-50.
- 133) **Aharonowitz, Y., Bergmeyer, J., Cantoral, J.M., Cohen, G., Demain, A.L., Fink, U., Kinghorn, J., Kleinkauf, H., MacCabe, A., Palissa, H. & et al.** (1993) Delta-(L-alpha-aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine synthetase, the multienzyme integrating the four primary reactions in beta-lactam biosynthesis, as a model peptide synthetase, *Biotechnology (N Y)*. **11**, 807-10.
- 134) **Bujard, H., Gentz, R., Lanzer, M., Stüber, D., Müller, M., Ibrahimi, I. & Häuptle, M.T.D., B.** (1987) A T5 promotor based transcription-translation system for the analysis of proteins *in vivo* and *in vitro*, *Meth. Enzymol*. **155**, 416-433.

- 135) **Gentz, R. & Bujard, H.** (1985) Promoters recognized by *Escherichia coli* RNA polymerase selected by function: highly efficient promoters from bacteriophage T5, *J. Bacteriol.* **164**, 70-7.
- 136) **Scutcliffe, J.G.** (1979) Complete nucleotide sequence of the *E. coli* plasmid pBR322, *Meth. Enzymol.* **43**, 77-90.
- 137) **Miller, J.H.** (1992) *A short course of bacterial genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- 138) **Farabough, P.J.** (1978) Sequence of the *lacI* gene, *Nature.* **274**, 765-769.
- 139) **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.
- 140) **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.
- 141) **Brown, T.A.** (1991) *Molecular Biology, Labfax*, , BIOS Scientific Publishers limited, Manchester, UK.
- 142) **Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T.** (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, , Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- 143) **Birnboim, H.C. & Doly, J.** (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA., *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513-1523.
- 144) **Vogelstein, B. & Gillespie, D.** (1979) Preparative and analytical purification of DNA from agarose, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**, 615-619.
- 145) **Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4, *Nature.* **227**, 491-493.
- 146) **Bennet, J. & Scott, K.J.** (1971) Quantitative staining of fraction I protein in polyacrylamide gels using Coomassie brilliant blue, *Anal. Biochem.* **43**, 173-182.
- 147) **Bradford, M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- 148) **Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F.A., Mullis, K.B., Horn, G.T., Ehrlich, H.A. & Arnheim, N.** (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of cell anemia, *Science.* **230**, 1350.



- 149) **Mullis, K.B. & Faloona, F.A.** (1987) Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction, *Meth. Enzymol.* **155**, 335-350.
- 150) **Hochuli, E., Döbeli, H. & Schacher, A.** (1987) New metal chelat absorbents selective for proteins and peptide containing neighbouring histidine residues, *J. Chromatography.* **411**, 177-184.
- 151) **Hochuli, E., Bannwarth, W., Döbeli, H., Gentz, R. & Stüber, D.** (1988) Genetic approach to facilitate purification of recombinant proteins with a novel chelat absorbent, *Bio/Technology.* **11**, 1321-1325.
- 152) **Hochuli, E.** (1989) Aufarbeitung von Bioproteinen: Elegant und wirtschaftlich, *Chemische Industrie.* **12**, 69-70.
- 153) **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.
- 154) **Stuhlberg, M.P. & Novelli, G.D.** (1960) Amino acid-activating enzymes: methods of assay, *Methods Enzymol.* **5**, 703-707.
- 155) **Gevers, W., Kleinkauf, H. & Lipmann, F.** (1968) The activation of amino acids for biosynthesis of gramicidin S, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **60**, 269-76.
- 156) **Skoog, D.A. & Leary, J.J.** (1992) *Principles of Instrumental Analysis: 4. ed.*, , Saunders College Publishing, New York.
- 157) **Schlumbohm, W., Vater, J. & Kleinkauf, H.** (1985) Reactive sulfhydryl groups involved in the aminoacyl adenylate activation reactions of the gramicidin S synthetase 2, *Biol Chem Hoppe Seyler.* **366**, 925-30.
- 158) **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.
- 159) **Ehmann, D.E., Trauger, J.W., Stachelhaus, T. & Walsh, C.T.** (2000) Aminoacyl-SNACs as small-molecule substrates for the condensation domains of nonribosomal peptide synthetases, *Chem Biol.* **7**, 765-72.
- 160) **von Döhren, H., Dieckmann, R. & Pavela-Vrancic, M.** (1999) The nonribosomal code, *Chem Biol.* **6**, R273-R279.

- 161) **Luo, L., Burkart, M., Stachelhaus, T. & Walsh, C.T.** (2001) Substrate Recognition and Selection by the Initiation Module PheATE of Gramicidin S Synthetase, **submitted**.
- 162) **Fernandez-Lopez, S., Kim, H.S., Choi, E.C., Delgado, M., Granja, J.R., Khasanov, A., Kraehenbuehl, K., Long, G., Weinberger, D.A., Wilcoxon, K.M. & Ghadiri, M.R.** (2001) Antibacterial agents based on the cyclic D,L-alpha-peptide architecture, *Nature*. **412**, 452-5.
- 163) **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**, 308-18.
- 164) **Doekel, S.** (2000) *Synthese von Dipeptiden an hybriden Peptidsynthetasen*, Dissertation, Philipps-Universität, Marburg.
- 165) **Schauwecker, F., Pfennig, F., Grammel, N. & Keller, U.** (2000) Construction and in vitro analysis of a new bi-modular polypeptide synthetase for synthesis of N-methylated acyl peptides, *Chem Biol*. **7**, 287-97.
- 166) **Ehmann, D.E., Shaw-Reid, C.A., Losey, H.C. & Walsh, C.T.** (2000) The EntF and EntE adenylation domains of Escherichia coli enterobactin synthetase: sequestration and selectivity in acyl-AMP transfers to thiolation domain cosubstrates, *Proc Natl Acad Sci U S A*. **97**, 2509-14.
- 167) **Weber, T., Stubbs, M., Bruner, S., Walsh, C.T. & Marahiel, M.** (2001) Crystal Structure of Surfactin Thioesterase Domain - submitted, *Structure*.
- 168) **Finking, R., Mofid, M.R. & Marahiel, M.A.** (2001) Recognition of Hybrid Peptidyl Carrier Proteins by ACPS and Sfp - unpublished.
- 169) **Mofid, M.R. & Marahiel, M.A.** (2001) persönliche Mitteilung.
- 170) **Dittmann, J., Wenger, R.M., Kleinkauf, H. & Lawen, A.** (1994) Mechanism of cyclosporin A biosynthesis. Evidence for synthesis via a single linear undecapeptide precursor, *J Biol Chem*. **269**, 2841-6.
- 171) **Schauwecker, F., Pfennig, F., Schroder, W. & Keller, U.** (1998) Molecular cloning of the actinomycin synthetase gene cluster from Streptomyces chrysomallus and functional heterologous expression of the gene encoding actinomycin synthetase II, *J Bacteriol*. **180**, 2468-74.
- 172) **Walzel, B., Riederer, B. & Keller, U.** (1997) Mechanism of alkaloid cyclopeptide synthesis in the ergot fungus Claviceps purpurea, *Chem Biol*. **4**, 223-30.

- 173) **Hahn, M. & Stachelhaus, T.** (2001) persönliche Mitteilung.
- 174) **Stachelhaus, T., Schneider, A. & Marahiel, M.A.** (1996) Engineered biosynthesis of peptide antibiotics, *Biochem Pharmacol.* **52**, 177-86.
- 175) **Mootz, H.D. & Marahiel, M.A.** (1999) Design and application of multimodular peptide synthetases, *Curr Opin Biotechnol.* **10**, 341-8.
- 176) **Eppelmann, K., Doekel, S. & Marahiel, M.A.** (2001) Engineered biosynthesis of the peptide antibiotic bacitracin in the surrogate host *Bacillus subtilis*, *J Biol Chem.* **11**, 11.
- 177) **Tang, L., Shah, S., Chung, L., Carney, J., Katz, L., Khosla, C. & Julien, B.** (2000) Cloning and heterologous expression of the epothilone gene cluster, *Science.* **287**, 640-2.



# Danksagung

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. M.A. Marahiel für die interessante Aufgabenstellung an der ich arbeiten durfte. In ihm hatte ich stets einen hilfreichen Ansprech- und Diskussionspartner. Insbesondere danke ich ihm auch für die Ermöglichung der Teilnahme an vier „Group-Meetings“ mit den amerikanischen Arbeitsgruppen von Prof. Dr. C.T. Walsh (Harvard Medical School), Prof. Dr. C. Khosla (Stanford University) und Prof. Dr. D. Cane (Brown University), auf welchen ich wertvolle Erfahrungen und Eindrücke sammeln konnte. Außerdem unterstützte er meine Teilnahme an mehreren bioanalytischen Workshops.

Herrn Prof. Dr. T. Schrader danke ich für seine Bereitschaft, das Zweitgutachten zu übernehmen.

Allen Mitarbeitern unseres Arbeitskreises danke ich für die kollegiale Atmosphäre, die gute Teamarbeit und ständige Hilfsbereitschaft. Insbesondere danke ich Veit Bergendahl und Thomas Wendrich für die gute Zusammenarbeit und Diskussionsbereitschaft bei bioanalytischen Fragestellungen. Henning Mootz und Torsten Stachelhaus waren für NRPS-spezifische Problemstellungen immer bereitwillig ansprechbare Diskussionspartner, auch dann, wenn sie eigentlich keine Zeit hatten. Vielen Dank ihr Zwei!

Besonders erwähnen möchte ich an dieser Stelle auch Dirk Schwarzer und Thomas Dürfarth, die das Manuskript in der Kürze der Zeit kritisch durchgesehen und dafür ihre eigene Arbeit zurückgestellt haben (wobei Dirks Kommentare dabei manchmal an Hyroglyphen erinnerten).

Meinen Vertiefungsstudenten Lin Müller, Miriam Bortfeld, Stephan Sieber, Alan Tanovic' und Britta Meißner danke ich für die praktische Unterstützung dieser Arbeit.

Meiner zukünftigen Frau Sabine und meinem Sohn Henning gilt in erster Linie mein Dank für die Unterstützung zu Hause und auch für ihr Verständnis dafür, dass es manchmal etwas später geworden ist...

Ihnen und meinen Eltern widme ich diese Arbeit.