

Die molekulare Logik der nichtribosomalen  
Peptidsynthetasen:  
Identifizierung und biochemische Charakterisierung der  
Biosynthesegene für Gramicidin A

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

dem  
Fachbereich Biologie  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

**Nadine Schracke**

geb. Keßler

aus Limburg a. d. Lahn

Marburg/Lahn 2005

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von März 2002 bis März 2005 am Fachbereich Chemie der Philipps-Universität unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. M. Marahiel durchgeführt.

Vom Fachbereich Biologie  
der Philipps-Universität Marburg als Dissertation  
am 11. April 2005 angenommen.

Erstgutachter:                   **Prof. Dr. M. Bölker**  
Zweitgutachter:               **Prof. Dr. M. A. Marahiel**

Tag der mündlichen Prüfung: 18. April 2005

Der Mensch hat dreierlei Wege, klug zu handeln:  
erstens durch Nachdenken, das ist das Edelste,  
zweitens durch Nachahmen, das ist das Leichteste,  
und drittens durch Erfahrung, das ist das Bitterste.

Konfuzius

Für meinen Mann Guido  
sowie meine Eltern und Oma Ursel.

Teile dieser Arbeit wurden publiziert in:

**Schracke N, Linne U and Marahiel MA:** Synthesis of linear Gramicidin requires the cooperation of two independent reductases. *Biochemistry* **2005**. In Revision; manuscript no. bi050074t.

**Kessler N, Schuhmann H, Morneweg S, Linne U and Marahiel MA:** The linear pentadecapeptide gramicidin is assembled by four multimodular nonribosomal peptide synthetases that comprise 16 modules with 56 catalytic domains. *J Biol Chem.* **2004** Feb 27;279(9):7413-9.

**Mootz HD, Kessler N, Linne U, Eppelmann K, Schwarzer D and Marahiel MA:** Decreasing the ring size of a cyclic nonribosomal peptide antibiotic by in-frame module deletion in the biosynthetic genes. *J Am Chem Soc.* **2002** Sep 18; 124(37):10980-1.

Weitere Publikationen:

**May JJ, Kessler N, Marahiel MA and Stubbs MT:** Crystal structure of DhbE, an archetype for aryl acid activating domains of modular nonribosomal peptide synthetases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2002** Sep 17; 99(19):12120-5.

## Zusammenfassung

Gramicidin ist ein Polypeptid, das aus 15 hydrophoben Aminosäuren mit alternierender L-D-Konfiguration besteht. *In vivo* bilden sich Homodimere, die in Membranen als Ionenkanäle fungieren. Die Primärstruktur von Gramicidin A lautet Formyl-Val<sub>1</sub>-Gly<sub>2</sub>-Ala<sub>3</sub>-DLeu<sub>4</sub>-Ala<sub>5</sub>-DVal<sub>6</sub>-Val<sub>7</sub>-DVal<sub>8</sub>-Trp<sub>9</sub>-DLeu<sub>10</sub>-Trp<sub>11</sub>-DLeu<sub>12</sub>-Trp<sub>13</sub>-DLeu<sub>14</sub>-Trp<sub>15</sub>-Ethanolamin. Das Peptid ist am N-Terminus durch N-Formylierung und am C-Terminus durch Ethanolamin vor Abbau geschützt.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Gencluster von 61 kb aus *B. brevis* ATCC 8185 mit Hilfe einer Fosmid-Genbank identifiziert und vollständig sequenziert, der für die Gramicidin A - nichtribosomale Peptidsynthetase (NRPS) kodiert. Ein Multienzymkomplex bestehend aus den 4 NRPS LgrABCD mit jeweils 2, 4, 6 und 4 Modulen konnte für Aufbau und Modifizierung des Pentadekapeptids charakterisiert werden. *In silico* Untersuchungen zur Definition der Substratspezifität aller 16 Module wurde durch biochemische Untersuchungen an drei Adenylierungsdomänen (LgrA1, LgrA2 und LgrB1) gestützt. Damit konnte das Kolinearitätsprinzip dieser NRPS bewiesen werden. Die putative C-terminale Reduktase (R) – Domäne, die an Modul 16 fusioniert ist, deutete auf die Freisetzung des N-formylierten Peptidsubstrats als Alkohol hin. Biochemische Untersuchungen an der rekombinanten R-Domäne mit Peptidyl-Substratvarianten haben gezeigt, daß diese eine ein-Schritt-Reduktion unter NAD(P)H-Verbrauch zum Aldehyd-Intermediat durchführt. Durch die Verwendung von verschiedenen Substrat-Varianten konnte weiter gezeigt werden, daß die R-Domäne eine breite Substrattoleranz besitzt.

Die Suche nach einer zweiten Reduktase, die das Peptidyl-Aldehyd zum Endprodukt Peptidyl-Ethanolamin umsetzt, hat zur Entdeckung der Aldoreduktase LgrE geführt. In gekoppelten Assays mit beiden rekombinanten Reduktasen konnte das Peptidyl-Ethanolamin produziert werden. Durch *in vitro* Umsetzung des enzymatisch hergestellten Peptidyl-Aldehyd-Intermediats mit LgrE konnte die strikte NADPH-Abhängigkeit dieses Enzyms gezeigt werden. Die Aldoreduktase wies im direkten Vergleich zur R-Domäne eine stringendere Substratspezifität auf.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde eine Methode für Modulaustausche in NRPS auf genetischer Ebene entwickelt. Dabei wird zunächst ein Genfragment gekoppelt an einen Marker ins Genom durch homologe Rekombination eingebracht. Im zweiten Schritt wird der Marker über *direct repeats* durch Ausloopen wieder entfernt. Das Genfragment bleibt erhalten, und das neue NRPS-Produkt kann analysiert werden.

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	5
1 Abkürzungsverzeichnis.....	8
2 Einleitung.....	12
2.1 Nichtribosomale Peptidsynthetasen.....	12
2.1.1 Die Adenylierungsdomäne.....	13
2.1.2 Das <i>peptidyl-carrier</i> -Protein und 4'-Phosphopanthetin-Transferasen.....	14
2.1.3 Die Kondensationsdomäne.....	16
2.1.4 Terminationsdomänen.....	17
2.1.5 Modifizierende Domänen.....	19
2.1.6 Thioesterasen vom Typ II.....	21
2.1.7 Externe Enzyme zur weiteren Modifikation der Peptidkette.....	22
2.1.8 Klassifizierung von NRPS.....	23
2.2 Lineares Gramicidin.....	24
2.3 Surfactin.....	25
2.4 Aufgabenstellung.....	26
3 Material.....	27
3.1 Geräte.....	27
3.2 Enzyme und Chemikalien.....	28
3.3 Mikroorganismen.....	29
3.4 Medien.....	29
4 Methoden.....	31
4.1 Plasmid-DNA-Isolierung für Sequenzierexperimente.....	31
4.2 Klonierung mit den TOPO-Vektoren von <i>Invitrogen</i> .....	31
4.2.1 pCR-XL-TOPO.....	31
4.2.2 pBAD202.....	32
4.3 Klonierung von pNK15.....	32
4.4 Isolation von genomischer DNA.....	33
4.5 Inverse PCR.....	34
4.6 Herstellung der Fosmid-Genbank.....	34
4.7 Überproduktion von Proteinen.....	34
4.8 Proteinreinigung mittels Ni <sup>2+</sup> -NTA-Affinitätschromatographie.....	35
4.9 ATP-PPi-Austausch.....	35
4.10 Beladungsassay.....	36
4.11 Reduktase-Assay.....	37
4.12 Analyse der Reduktase-Assays mit HPLC-MS.....	37
4.13 Peptidyl-CoA-Synthese.....	38
4.14 Photometrischer Reduktase-Assay.....	38
4.15 Synthese des Aldehyd-Substrates.....	39
4.15.1 Strategie 1.....	39
4.15.2 Strategie 2.....	39
4.15.3 Strategie 3.....	40
4.16 Synthese von N <sup>10</sup> -formyl-Tetrahydrofolat.....	40
4.17 Formyltransferaseassay.....	41
5 Ergebnisse - Biosynthese von Gramicidin A.....	42
5.1 Der <i>lgr</i> - Genkluster.....	42
5.1.1 Identifizierung und Sequenzierung der Lgr – Synthetasen.....	42
5.1.2 Genomkartierung und inverse PCR.....	44
5.1.3 Fosmid - Genbank.....	47
5.1.4 Analyse der <i>lgr</i> - Region.....	49

5.1.5	Die A-Domänen .....	50
5.1.6	Die Formyltransferase – Domäne .....	53
5.1.6.1	Versuche zur biochemischen Charakterisierung der F-Domäne.....	54
5.2	Die E-Domäne von LgrA2 .....	57
5.3	Die Reduktase – Domäne .....	57
5.4	Biochemische Charakterisierung der Reduktase-Domäne.....	60
5.5	Untersuchungen der R-Domäne mit einem Peptidyl-CoA-Substrat .....	61
5.5.1	Quantifizierung durch photometrische Assays .....	63
5.5.2	Einfluß der C-terminalen Aminosäure auf die Reduktions-Reaktion .....	64
5.5.3	Einfluß der Stereochemie auf die Substratakzeptanz der R-Domäne .....	65
5.5.4	Kristallisationsversuche mit der R-Domäne .....	65
5.6	Die Aldoreduktase LgrE .....	66
5.6.1	Chemische Synthese des Aldehyd-Substrats .....	70
5.6.2	Enzymatische Synthese des Aldehyd-Substrats.....	71
6	Diskussion .....	73
6.1	Der <i>lgr</i> – Genkluster.....	73
6.2	Die A-Domänen .....	74
6.3	Die F-Domäne .....	75
6.4	Die E-Domäne von LgrA .....	76
6.5	Die R-Domäne .....	77
6.6	Die Aldoreduktase LgrE .....	79
7	Studie – Etablierung einer neuen genetischen Methode für Modulaustausche in NRPS - Systemen .....	82
7.1	Ausblick zur Verbesserung der Ausloopen-Strategie .....	86
8	Quantifizierung der Surfactin-Produktion nach Austausch der Biosynthesegene .....	88
9	Literaturverzeichnis.....	91
10	Anhang .....	96
10.1	Konservierte Bereiche bei NRPS ( <i>core motifs</i> ) .....	96
10.2	Verwendete Oligonukleotide .....	97

# 1 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
AS	Aminosäure(n)
A-Domäne	Adenylierungsdomäne
Abb.	Abbildung
ACP	<i>acyl carrier protein</i>
Amp	Ampicillin
amu	<i>atomic mass units</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ATCC	Stammsammlung ( <i>American type culture colony</i> )
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
ddATP	Didesoxyadenosintriphosphat
C	Cytosin
CFU	kolonienformende Einheit ( <i>colony forming unit</i> )
Cm	Chloramphenicol
C-Domäne	Kondensationsdomäne ( <i>condensation-domain</i> )
CoA	Koenzym A
Cy-Domäne	Heterozyklisierungsdomäne ( <i>cyclization-domain</i> )
Da	Dalton
ddH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DHB	Dihydroxybenzoat
DIBAL-H	Diisobutyl-Aluminiumhydrid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>desoxyribonucleic acid</i> )
dNTP	2'-Desoxynucleosid-5'-Triphosphat
ds	Doppelstrang (double strand)
E	Extinktion
E-Domäne	Epimerisierungsdomäne
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
F-Domäne	Formylierungsdomäne

FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
F <sub>moc</sub>	Fluoromethoxycarbonyl
formylTHF	N <sup>10</sup> -formyl-Tetrahydrofolat
G	Guanin
h	Stunde(n)
HBTU	2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-Tetramethyluronium Hexafluorophosphat
HEPES	2-N'-[N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazinyl]-Ethansulfonsäure
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
IMAC	immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalaktosid
Kan	Kanamycin
k	kilo
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani Medium
LC/MS	<i>liquid chromatography / mass spectrometry</i>
m	milli (10 <sup>-3</sup> )
μ	mikro (10 <sup>-6</sup> )
Mega	10 <sup>6</sup>
M-Domäne	Methylierungsdomäne
MALDI-TOF	<i>matrix assisted laser desorption ionization-time of flight</i>
MCS	Polylinker ( <i>multiple cloning site</i> )
MeOH	Methanol
MLS	Makrolid-Linkosamin-Streptogramin B
mRNA	<i>messenger RNA</i>
n	nano (10 <sup>-9</sup> )
n.d.	nicht detektierbar
NRPS	nichtribosomale Peptidsynthetase(n)
NTA	Nitrilotriacetat
NTP	Nukleotidtriphosphat
OAc	Acetat
OD	optische Dichte

ORF	offenes Leseraster ( <i>open reading frame</i> )
ori	Replikationsursprung
Ox-Domäne	Oxidorekutasedomäne
p	piko ( $10^{-12}$ )
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCP	Thiolierungsdomäne ( <i>peptidyl carrier protein</i> )
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
4'Ppant	4'-Phosphopanthetein
PP <sub>i</sub>	anorganisches Pyrophosphat
PyBop	Benzotriazol-1-yl-Oxy-Tris-Pyrrolidino-Phosphonium Hexafluorophosphat
RBS	ribosomale Bindungsstelle
R-Domäne	Reduktasedomäne
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
S.	Seite
SDS	Natriumlaurylsulfat
SNAC	N-Acetylcysteamin
ss	Einzelstrang ( <i>single strand</i> )
T	Thymin
TE-Domäne	Thioesterasedomäne
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran / 6(S)-5,6,7,8-Tetrahydrofolat
TIPS	Triisopropylsilan
Tris	Tris-Hydroxymethylaminomethan
U	Uracil
ü.N.	über Nacht
upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolettes Licht
v / v	Volumen pro Volumen
w / v	Gewicht pro Volumen
wt	Wildtyp

Xaa beliebige Aminosäure  
z. B. zum Beispiel

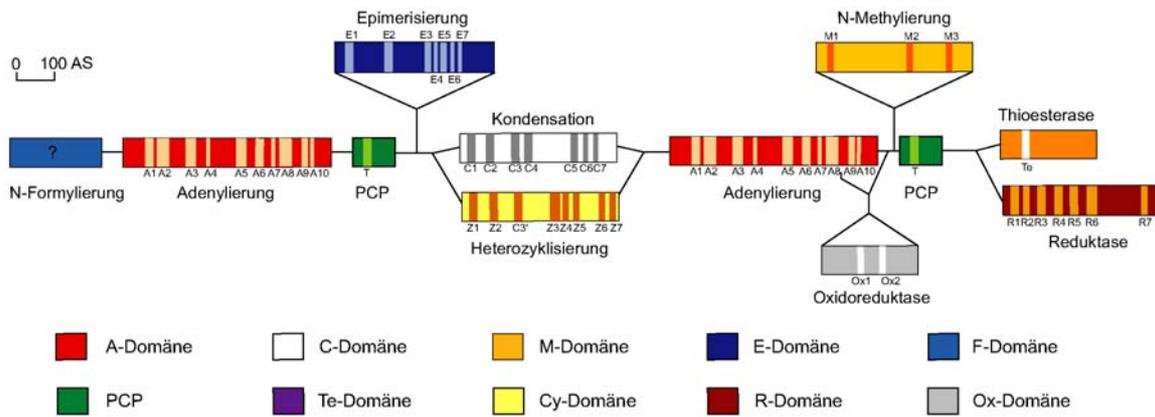
<b>Aminosäure</b>	<b>3- Buchstabencode</b>	<b>1-</b>	<b>MW [g/mol]</b>
Alanin	Ala	A	89
Arginin	Arg	R	174
Asparagin	Asn	N	132
Aspartat	Asp	D	133
Cystein	Cys	C	121
Glutamat	Glu	E	147
Glutamin	Gln	Q	146
Glycin	Gly	G	75
Histidin	His	H	155
Isoleucin	Ile	I	131
Leucin	Leu	L	131
Lysin	Lys	K	146
Methionin	Met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

## 2 Einleitung

### 2.1 Nichtribosomale Peptidsynthetasen

Eine Vielzahl von Bakterien und Pilzen produzieren eine immense Anzahl Sekundärmetabolite, die sowohl funktionell als auch strukturell eine erstaunliche Vielfalt aufweisen (2, 3). Zu diesen gehören die nichtribosomal synthetisierten Peptide, die oft antibiotische, antifungale, cytostatische oder immunsuppressive Eigenschaften besitzen. Die zyklischen, verzweigt-zyklischen oder linearen Peptide zeichnen sich u.a. durch das Vorhandensein von Heterozyklen, D-Aminosäuren oder glykosilierten bzw. N-methylierten Aminosäuren aus, die essentiell für die Bioaktivität sind. Bereits in den 70er Jahren wurde von Fritz Lipmann ein DNA-unabhängiger Synthesemechanismus für Gramacidin S und Tyrocidin von verschiedenen *Bacillus*-Spezies gezeigt (4). Es wurde gezeigt, daß beide Antibiotika von extrem großen Enzymen ähnlich wie bei der Fettsäuresynthese produziert wurden. Inzwischen wurden diese Enzyme, die nichtribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS), in zahlreichen Organismen von Prokaryoten bis hin zur Maus gefunden und eingehend biochemisch charakterisiert.

NRPS sind modular aufgebaute Multienzymkomplexe. Ein Modul besitzt alle notwendigen katalytischen Aktivitäten, um ein Substrat selektiv zu erkennen, zu aktivieren, und als Thioester-Intermediat kovalent zu binden. Gegebenfalls können diese Intermediate modifiziert werden, während sie in die wachsende Peptidkette integriert werden. Diese katalytischen Aktivitäten sind innerhalb der Module auf verschiedene Domänen aufgeteilt, wobei aus einer begrenzten Anzahl an Domänen durch ein einfaches Baukastensystem eine große Vielfalt an Produkten generiert wird. Dabei kann man zwischen den essentiellen Domänen (Adenylierung, *peptidyl-carrier*-Protein, Kondensation, Termination) und modifizierenden Domänen (Epimerisierung, Heterozyklisierung, Oxidation, N-Methylierung, N-Formylierung) unterscheiden. Im Folgenden werden diese Domärentypen eingehend beschrieben. Abb. 2-1 zeigt die typische Domänenabfolge, wie sie bei bakteriellen NRPS vom Typ A (lineare NRPS, siehe 2.1.8) vorkommt (5). Der Farbcode für die einzelnen Domänen wird in dieser Arbeit durchweg wie in Abb. 2-1 definiert verwendet. Im Anhang befindet sich eine Tabelle, die die bislang gefundenen konservierten Motive (*core motifs*) der einzelnen Domärentypen enthält.



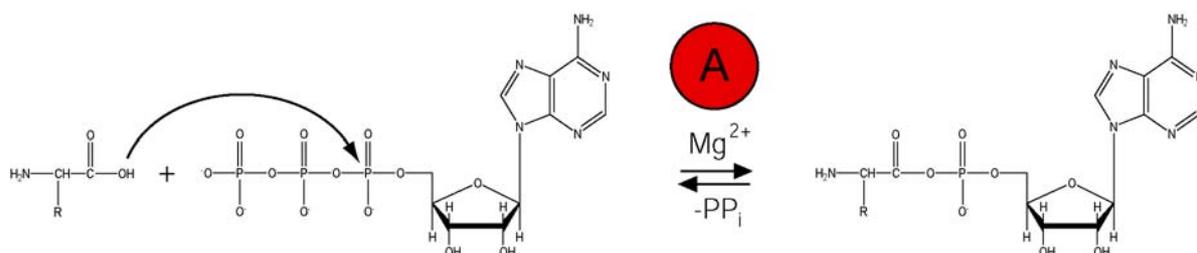
**Abbildung 2-1:**

Übersicht über die typischen Domänenabfolgen bei NRPS. Die konservierten Motive sind farblich

### 2.1.1 Die Adenylierungsdomäne

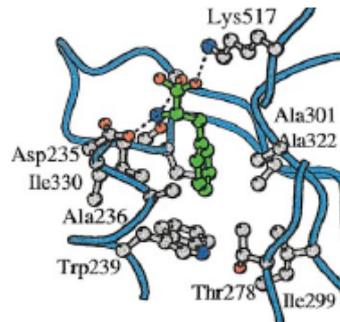
Der erste Schritt in der nichtribosomalen Peptidsynthese ist von besonderer Bedeutung, da hier die Zusammensetzung des Produktes determiniert wird. Die in etwa 550 AS große Adenylierungsdomäne (A-Domäne) erkennt und aktiviert unter ATP-Hydrolyse spezifisch eine Aminosäure als Aminoacyladenylat (s. Abb. 2-2). Dieser Oxoester wird anschließend durch einen nukleophilen Angriff der freien Thiolgruppe des 4'-Phosphopanthetein-Kofaktors des benachbarten PCPs unter Freisetzung von AMP in einen Thioester umgewandelt (s. Abb. 2-4). Die Aktivierung der Aminosäure erfolgt analog der bei tRNA-Synthasen der ribosomalen Peptidsynthese. Allerdings gibt es keinen strukturellen oder funktionellen Zusammenhang zwischen A-Domänen und tRNA-Synthetasen.

Durch Analyse der Tertiärstrukturen der A-Domänen PheA der GrsA-NRPS (1) sowie DhbE der DHB-NRPS (6) konnten die Aminosäurereste genau definiert werden, die für die Substratspezifität des Enzyms verantwortlich sind. Es handelt sich hierbei um 10 Aminosäuren, die seitdem als Spezifitätscode bezeichnet werden ((7), s. Abb. 2-3). Dieser Spezifitätscode erlaubt mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Vorhersage



**Abbildung 2-2:**

Die A-Domäne katalysiert die Aktivierung der Aminosäure unter ATP-Verbrauch zum Aminoacyladenylat.



**Abbildung 2-3:**

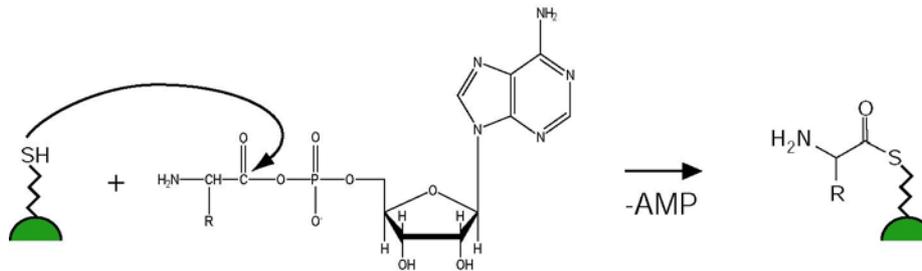
Darstellung der katalytischen Tasche der PheA A-Domäne.  
Die Substrataminosäure Phe ist grün markiert.

des Substrates der jeweiligen A-Domäne anhand ihrer Sequenz. Durch Vergleich von neuen A-Domänen mit der Struktur von PheA kann man den Spezifitätscode der neuen A-Domänen bestimmen. Dieser wird dann mit Spezifitätscodes von allen bereits bekannten und biochemisch charakterisierten A-Domänen aus Datenbanken verglichen (z.B. <http://raynam.chm.jhu.edu/~nrps/index.html>). So kann eine Substratspezifität der neuen A-Domäne postuliert werden. Bislang wurden mehrere hundert Substrate für A-Domänen beschrieben.

Experimentell kann die Substratspezifität einer A-Domäne *in vitro* im sogenannten ATP-PP<sub>i</sub>-Austausch nach Zusatz von radioaktiv markiertem PP<sub>i</sub> bestimmt werden, da die Aktivierungsreaktion reversibel als Gleichgewichtsreaktion erfolgt. Wird das kognate Substrat zugegeben und erfolgt die Reaktion durch die A-Domäne, so entsteht in der Rückreaktion radioaktives ATP, welches vom Reaktionsgemisch abgetrennt und quantifiziert werden kann. Auf diese Art und Weise können auch Kinetiken für A-Domänen bestimmt werden.

### 2.1.2 Das *peptidyl-carrier*-Protein und 4'-Phosphopanthetin-Transferasen

Das *peptidyl-carrier*-Protein (PCP), früher auch Thiolierungsdomäne (T-Domäne) genannt, stellt das gemeinsame Element in der Biosynthesestrategie der Peptidsynthetasen, Polyketidsynthetasen und Fettsäuresynthetasen dar (2, 8). Das etwa 90-100 AS große PCP trägt als Thioester aktivierte Aminoacyl- und Peptidylgruppen an seiner prosthetischen Gruppe 4'-Phosphopanthetin (4'Ppant), besitzt jedoch selbst keine katalytische Aktivität. Der etwa 20 Å lange 4'Ppant-Arm ist sehr flexibel und kann so die an ihm gebundenen Intermediate zu den reaktiven Zentren benachbarter Domänen transportieren.



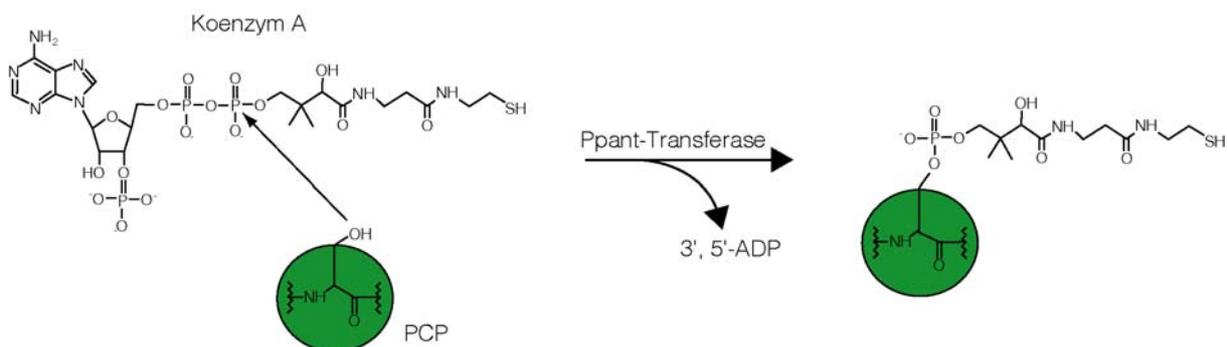
**Abbildung 2-4:**

Das Aminoacyladenylat wird unter Freisetzung von AMP als Thioester ans PCP gebunden.

Thioester sind im Vergleich zu Oxoestern deutlich reaktiver aufgrund der geringeren Mesomeriestabilisierung. Das als Thioester gebundene Peptid erleichtert die folgende Peptidbindungsbildung.

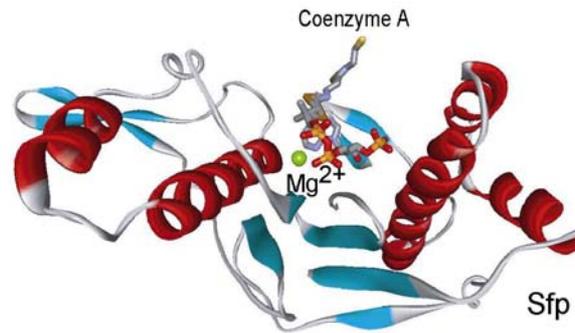
Damit das PCP aber funktionell aktiv ist, muß es zunächst posttranslational von einer 4'-Phosphopantetheintransferase unter Verbrauch von Koenzym A von der *apo*- in die *holo*-Form konvertiert werden. Dabei wird der 4'-Phosphopantetheinrest des Koenzym A (CoA) auf einen hochkonservierten Serinrest des PCPs übertragen. An die Sulfhydrylgruppe können anschließend beliebige Substrate als Thioester gebunden werden (s. Abb. 2-5).

Die bestuntersuchte 4'Ppant-Transferase ist Sfp aus *Bacillus subtilis*, von der viele biochemische Daten sowie die Kristallstruktur vorhanden sind (9, 10). So konnte bei *in vitro* Untersuchungen gezeigt werden, daß Sfp nicht nur verschiedenste PCPs als Substrat akzeptiert, sondern auch *acyl-carrier*-Proteine (ACPs) der Fettsäuresynthese sowie der Polyketidsynthasen in die *holo*-Form überführen kann. Desweiteren verwendet Sfp nicht ausschließlich CoA zur Modifikation, sondern auch Acetyl-CoA und Aminoacyl- und Peptidyl-CoAs dienen als Substrate, was anhand der Kristallstruktur erklärt werden kann. Sfp besteht aus 224 Aminosäuren und weist die Konformation eines Pseudo-Homodimers auf, wodurch das Protein in zwei



**Abbildung 2-5:**

Posttranslationale *apo*- zu *holo*-Konvertierung des PCPs unter Verbrauch von Koenzym A.



**Abbildung 2-6:**

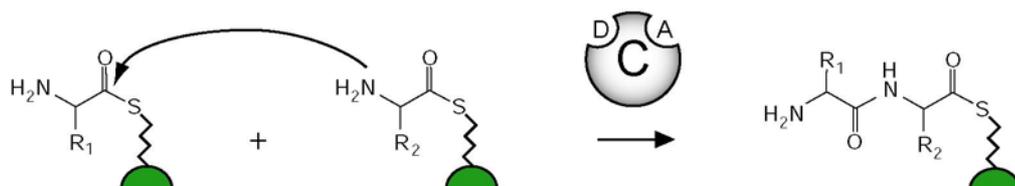
Kristallstruktur von Sfp aus *B. subtilis* mit CoA und  $Mg^{2+}$ .

ähnliche Subdomänen unterteilt ist. An der Grenze der beiden Subdomänen befindet sich die Substratbindetasche für CoA, in der CoA in einer bislang einzigartigen Weise gebunden wird. Das Molekül wird in der Bindetasche gebogen, und der 4'-Ppant-Rest ragt vermutlich aus der Tasche heraus in die Peripherie, ist also nicht an der Erkennung von Substrat und Enzym beteiligt (s. Abb. 2-6; (10)).

Es ist möglich, ein PCP *in vitro* unter Katalyse von Sfp mit Aminoacyl- oder Peptidyl-S-CoAs von der *apo*- in die *holo*-Form zu überführen, wodurch man ein vorbeladenes PCP erhält (11). Dieses kann dann das an ihm gebundene Substrat weiteren benachbarten Domänen zur Verfügung stellen. Der Vorteil dieser *in vitro* Beladungsmethode ist, das beliebige Substrate nach Kupplung an CoA für die Modifikationen benutzt werden können, so daß vielfältige biochemische Untersuchungen z.B. benachbarter Terminationsdomänen möglich werden.

### 2.1.3 Die Kondensationsdomäne

Die etwa 450 AS große Kondensationsdomäne (C-Domäne) katalysiert die Peptidbindungsbildung zwischen der als Thioester aktivierte Carboxyl- und der freien Aminogruppe zweier auf benachbarten Modulen gebundenen Acylgruppen (s. Abb. 2-7). Die essentielle Rolle in der Katalyse der Peptidbindungsbildung konnte durch Mutationsanalysen gezeigt werden (12, 13). Bis heute konnte kein



**Abbildung 2-7:**

Die C-Domäne katalysiert die Peptidbindungsbildung zwischen den Substraten von zwei benachbarten Acyl-PCPs.

biochemischer Assay für die katalytische Funktion der C-Domäne entwickelt werden, so daß über den Reaktionsmechanismus selbst nur spekuliert werden kann. Dieser konnte auch durch die Kristallstruktur der C-Domäne VibH der Vibriobactin-Synthetase nicht geklärt werden (14). Durch verschiedene Studien konnte aber gezeigt werden, daß die C-Domäne den nukleophilen Angriff der freien Aminogruppe des Aminoacyl-S-Ppant-Akzeptors auf das elektrophile Carboxy-C-Atom des Aminoacyl- oder Peptidyl-S-Ppant Donors katalysiert.

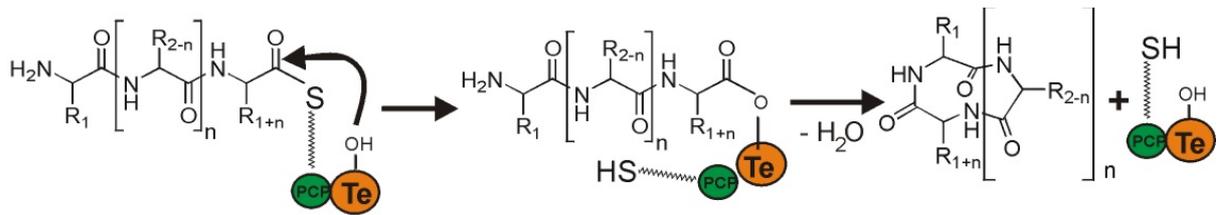
Weiterhin wurden biochemische Studien mit einem Minimalsystem bestehend aus GrsA (A-PCP-E) und dem ersten Modul von GrsB (C-A-PCP) aus der Gramcidin S-NRPS aus *Bacillus brevis* ATCC 9999 durchgeführt (15). Dabei wurde entweder das erste oder zweite PCP mit nicht-nativen Substraten beladen. Es zeigte sich, daß die C-Domäne selektiv für das Akzeptor-Substrat des *downstream* liegenden PCPs besonders mit Hinblick auf die Stereochemie war, jedoch weniger unspezifisch für das Donor-Substrat des *upstream* liegenden PCPs, so daß im Enzym eine Akzeptor- und eine Donor-Stelle vermutet wurden. Diese Annahme konnte durch die Kristallstruktur von VibH bestätigt werden (14).

Eine Analyse der ersten C-Domäne der Tyrocidin-Synthetase TycC zeigte weiterhin, daß diese C-Domäne nur Akzeptor-Substrate mit der erwarteten Kettenlänge sowie mit korrekter Enantioform der C-terminalen Aminosäure als Substrat akzeptierte (16). Somit scheinen neben den A-Domänen auch C-Domänen durch ihre Selektivität Einfluß auf die Produktzusammensetzung in der nichtribosomalen Peptidsynthese zu haben.

#### **2.1.4 Terminationsdomänen**

Die Terminationsdomäne bei den meisten bisher bekannten bakteriellen Peptidsynthetasensystemen ist eine etwa 250 AS große Thioesterasedomäne (TE-Domäne), die unmittelbar auf das letzte PCP der NRPS folgt. Diese ist für die Freisetzung oder Multimerisierung des Produktes verantwortlich (17, 18). Durch biochemische Untersuchungen sowie Analyse der Kristallstruktur der TE-Domäne der Surfactin-NRPS konnte der mechanistische Aspekt genauer erforscht werden (19). Es wurde eine katalytische Triade ähnlich der von Serinproteasen gefunden, die aus je einem Aspartat-, Histidin- und Serinrest besteht.

Nachdem die lineare Peptidkette vom letzten PCP auf einen invarianten Serinrest der TE-Domäne übertragen wurde, gibt es je nach TE-Domäne verschiedene Möglichkeiten der Produktabspaltung (s. Abb. 2-8). Diese kann hydrolytisch erfolgen



**Abbildung 2-8:**

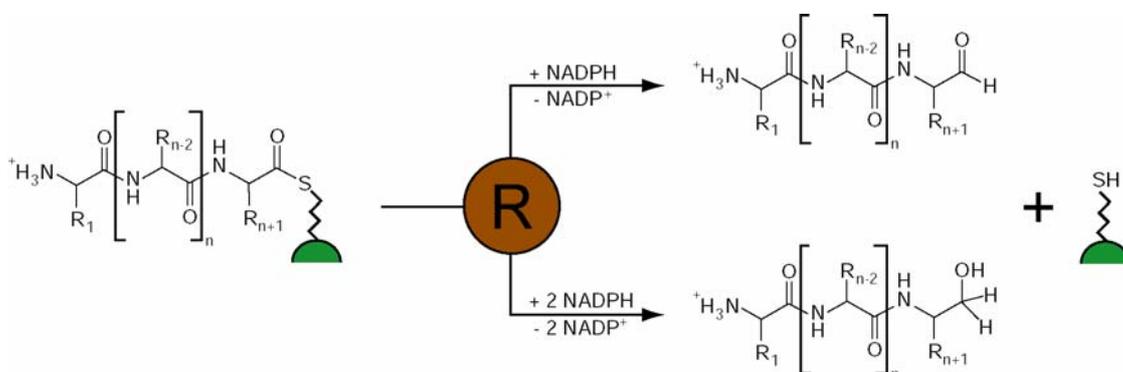
Reaktionsmechanismus einer Thioesterase, die ein zyklisches Peptid freisetzt.

(z.B. ACV-Tripeptid, Vancomycin), durch Makrozyklisierung zum Laktam (z.B. Tyrocidin, Gramicidin S) oder durch Laktonisierung (z.B. Surfactin, Daptomycin). Es sind auch verzweigt-zyklische Produkte möglich (z.B. Bacitracin, Depsipeptide) (17).

Seltener wird die Abspaltung des Produktes von einer Reduktasedomäne (R-Domäne) katalysiert. Dabei kann es zu zwei verschiedenen Stufen der Reduktion der letzten Aminosäure kommen, nämlich bis zum Aldehyd oder bis zum Alkohol (s. Abb. 2-9).

Die Reduktasedomäne MxcG des Myxochelinoperons aus *Stigmatella aurantiaca* SG a15 katalysiert unter NAD(P)H-Verbrauch die Reduktion des Peptides zum Aldehyd-Intermediat und weiter zum Alkohol Myxochelin A (20). Es werden aber auch Aldehyd-Intermediate freigesetzt, die dann von MxCL transaminiert werden zum Produkt Myxochelin B (21, 22).

Bei vielen Arten der Gattung *Funghi*, u.a. *Saccharomyces cerevisiae*, findet man die NRPS Lys2, die für den Lysin-Stoffwechsel essentiell ist (23). Diese besteht aus einer A-Domäne, einem PCP und einer R-Domäne. Die A-Domäne aktiviert  $\alpha$ -Aminoacidat zum entsprechenden  $\alpha$ -Aminoacidat-Adenylat, welches nach Abspaltung von AMP kovalent als Thioester am PCP gebunden wird. Die R-Domäne



**Abbildung 2-9:**

Die R-Domäne kann den Thioester entweder zum Aldehyd oder eine Stufe weiter zum Alkohol reduzieren; dabei wird NADPH verbraucht.

reduziert dieses als Thioester aktivierte  $\alpha$ -Aminoadipat unter NADPH-Verbrauch am  $C_6$  zum  $\alpha$ -Aminoadipat-Semialdehyd. Dieses kann nach der Freisetzung schnell reversibel intramolekular zu  $\Delta^1$ -Piperidin-Carboxylat zyklisieren, wobei die offenkettige Form in zwei aufeinanderfolgenden enzymatischen Schritten in Lysin konvertiert werden kann.

Die dritte bekannte, jedoch nicht biochemisch charakterisierte, R-Domäne aus der Saframycinsynthetase SafA aus *Myxococcus xanthus* reduziert das Substrat wahrscheinlich zum  $\text{Ala}_1\text{-Gly}_2\text{-LTyr}_3\text{-LTyr}_4\text{-CHO}$ -Intermediat, welches dann intramolekular Schiff'sche Basen formt und zu einem stabilen Sechsring-Hemiaminal zyklisiert (24).

Die vierte R-Domäne aus der Nostocyclopeptid-Synthetase NcpB aus *Nostoc sp.* ATCC 53789 wurde ebenfalls bislang nicht biochemisch charakterisiert (25). Es scheint jedoch klar zu sein, daß das an das letzte PCP von NcpB gebundene Peptid  $\text{Tyr}_1\text{-Gly}_2\text{-DGln}_3\text{-Ile}_4\text{-Ser}_5\text{-metPro}_6\text{-Leu}_7\text{-Phe}_7\text{-S-R}$  durch eine ein-Schritt-Reduktion freigesetzt wird. Anschließend greift wahrscheinlich die Aminogruppe der N-terminalen Aminosäure Tyrosin den Aldehyd an, so daß eine Imin-Zyklisierung stattfindet. Ob die R-Domäne oder ein anderes Enzym die Katalyse des letzten Schritts durchführt, ist bislang unbekannt.

Kürzlich konnte eine 1.100 AS große NRPS, U26, im Genom der Maus identifiziert werden, die aus drei Domänen besteht: A-PCP-PQQ (26). Die PQQ-Domäne enthält sieben Pyrroloquinolin Quinon (PQQ)-Bindemotive und dient vermutlich der Oxidation von 2-Aminoadipat-6-Semialdehyd zu 2-Aminoadipat. Somit scheint es sich bei der von U26 katalysierten Reaktion um einen reversen Lys2-Stoffwechselweg zu handeln, der dem Abbau von Lysin dient.

### 2.1.5 Modifizierende Domänen

Bislang konnten mehrere modifizierende Domänen beschrieben werden, die optional Bestandteil eines Moduls sein können.

Die wohl häufigste dieser Domänen ist die **Epimerisierungsdomäne** (E-Domäne), was zum Vorhandensein von D-Aminosäuren in fast allen bekannten NRPS Produkten führt. Die E-Domäne ist in der Lage, eine L- $\alpha$ -Aminosäure durch Invertierung des Stereozentrums am  $C_\alpha$  Atom in eine D- $\alpha$ -Aminosäure zu konvertieren, wobei ein D/L-Gleichgewicht entsteht (27, 28). Die Selektion bei der Peptidbindungsbildung für die richtige Stereoform obliegt hierbei der C-Domäne wie

unter 2.1.3 beschrieben. Das Vorkommen von D- $\alpha$ -Aminosäuren ist eine der charakteristischen Eigenschaften der Produkte der nichtribosomalen Peptidsynthese und ist wahrscheinlich für die oftmals zyklischen Peptide von konformationeller Bedeutung. In pilzlichen NRPS hingegen findet man häufiger D-Aminosäuren-aktivierende A-Domänen, die das Vorhandensein einer E-Domäne überflüssig machen, z.B. bei der Cyclosporin-Synthetase. Hier wird das Substrat DAla durch eine externe Racemase zur Verfügung gestellt.

Hinsichtlich ihrer Funktion lassen sich zwei Typen von E-Domänen unterscheiden. Man findet in Initiationsmodulen Aminoacyl-E-Domänen, welche die Epimerisierung eines Aminoacyl-S-Ppant Substrates katalysieren. In Elongationsmodulen findet man Peptidyl-E-Domänen, die die C $_{\alpha}$ -Epimerisierung erst auf Peptidyl-S-Ppant Ebene katalysieren, also nachdem die Peptidbindungsbildung stattgefunden hat. Weiterhin wurde entdeckt, daß Peptidyl-E-Domänen, die keine Aminoacyl-S-PCPs epimerisieren, dies *in vitro* doch können, wenn die C-Domäne dieses Moduls fehlt (29). Daraus wurde die Annahme postuliert, daß die C-Domäne den Aminoacyl-S-Ppant-Arm des *downstream* liegenden PCPs in der Akzeptor-Stelle festhält, bis die Peptidbindungsbildung abgeschlossen ist. Erst dann wird der Peptidyl-S-Ppant-Arm wieder freigesetzt, und die E-Domäne epimerisiert die C-terminale Aminosäure. Fehlt die C-Domäne, wird der beladene Ppant-Arm nicht festgehalten, und die E-Domäne führt ihre Reaktion bereits auf Aminoacyl-Ebene aus. Diese Erkenntnisse haben das Verständnis für Timing sowie Funktionsweise der nichtribosomalen Peptidsynthese enorm vorangetrieben.

**Heterozyklisierungsdomänen** (Cy-Domänen) findet man in Peptidsynthetasen, die die Bildung von Heterozyklen in der Peptidkette katalysieren; sie ersetzen dabei die C-Domäne des entsprechenden Moduls (30, 31). Beispiele hierfür sind das Peptidantibiotikum Bacitracin und die Siderophore Yersiniabactin und Pyochelin. Die Cy-Domäne bildet aus einer Cystein- und einer Serin- oder Threoninseitenkette einen fünfgliedrigen Thiazolin- oder Oxazolinring. Dieser kann Metall chelatisieren oder interkalierende Eigenschaften besitzen, die für die Funktion des Antibiotikums essentiell sind, z.B. bei Bacitracin.

Zusätzlich können **Oxidoreduktionsdomänen** (Ox-Domänen) die weitere Oxidation bzw. Reduktion von Thiazolinringen zu Thiazolidin- bzw. Thiazolringen katalysieren (32, 33). Diese Ox-Domänen werden nur in NRPS gefunden, die eine Cy-Domänen

beinhalten, was im Einklang mit ihrer Funktion steht. Für beide Domänen ist der Reaktionsmechanismus nicht vollständig geklärt.

Die **N-Methylierungsdomäne** (M-Domäne) trägt ebenfalls beachtlich zur Strukturvielfalt der Produkte der nichtribosomalen Peptidsynthetasen bei. M-Domänen sind etwa 420 AS groß und verwenden S-Adenosinmethionin als Methylgruppendonor für die Methylierung der  $\alpha$ -Aminogruppe ihres Substrates, z.B. bei Cyclosporin oder Pristinamycin (34). Die Reaktion findet vor der Peptidbindungsbildung auf Aminoacylstufe statt (35, 36). Die Methylierung bestimmter Aminosäuren scheint ähnlich wie die Epimerisierung von großer konformationeller Bedeutung zu sein und erleichtert wahrscheinlich die Zyklisierung der Peptidkette.

Bislang wurde ein Beispiel für eine **N-Formyltransferase-Domäne** (F-Domäne) gezeigt, nämlich am N-Terminus der Anabaenopeptidid-Synthetase ApdA aus *Anabaena* Stamm 90 (37). Es gibt noch keine biochemischen Untersuchungen zu diesem Domärentyp, jedoch wird angenommen, daß diese Domäne die erste Aminosäure, Glutamin, unter Verbrauch von N<sup>10</sup>-formyl-Tetrahydrofolat N-formyliert. In dieser Arbeit wurde eine zweite F-Domäne identifiziert, die am N-Terminus der Gramacidin-Synthetase LgrA lokalisiert ist. Beide F-Domänen zeigen hohe Ähnlichkeit zu Methionin-tRNA-Formyltransferasen des Primärstoffwechsels von verschiedensten Bakterienarten.

### 2.1.6 Thioesterasen vom Typ II

Sfp (s. 2.1.2) kann neben CoA auch Acetyl-CoA für die posttranslationale Modifikation verwenden, was zu acetylierten *holo*-PCPs führt, die die NRPS an dieser Stelle permanent blockieren. Um diese PCPs wieder zu regenerieren bedarf es eines weiteren Enzyms, nämlich einer Thioesterase vom Typ II, die von einem separaten Gen kodiert wird. Diese ist spezifisch für acetylierte *holo*-PCPs und akzeptiert keine acetyl-*holo*-ACPs, die für die Fettsäuresynthese essentiell sind (38). Es wurde kürzlich auch eine Spezifität für Aminoacyl-S-PCPs gezeigt, so daß auch solche NRPS regeneriert werden können, bei denen die A-Domäne eine falsche Aminosäure aktiviert hat, die nun von der C-Domäne nicht akzeptiert wird und das PCP für die weitere Biosynthese blockiert (39).

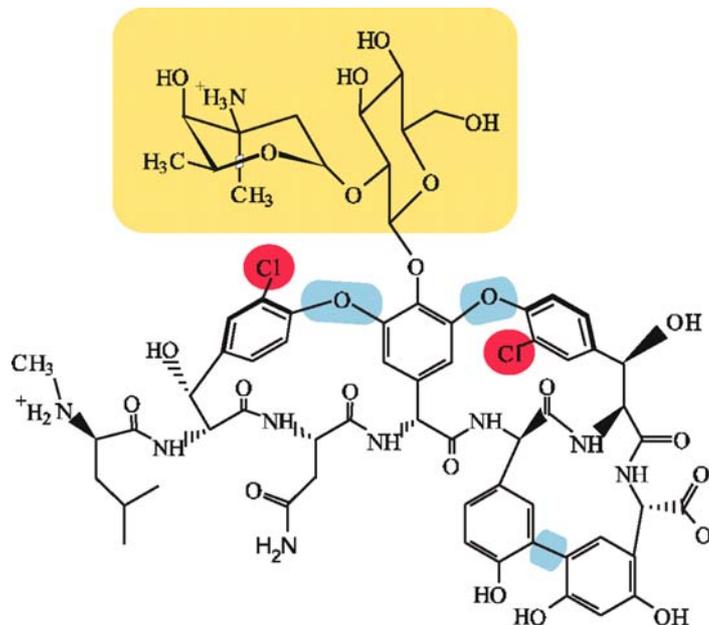


Abbildung 2-10:

Struktur von Vancomycin. Rot, Halogenierung. Blau, oxidatives *cross-linking*. Gelb, O-Glykosilierung.

### 2.1.7 Externe Enzyme zur weiteren Modifikation der Peptidkette

Neben den *in cis* arbeitenden NRPS-Domänen findet man häufig auch sogenannte externe Enzyme, die *in trans* Modifikationen an der Peptidkette durchführen, die häufig essentiell für die Bioaktivität des Produktes sind. Prominente Beispiele hierfür sind die vielfältigen Glykosyl-Transferasen (z.B. bei Vancomycin (s. Abb. 2-10) bzw. Chloroeremomycin), Halogenasen (Vancomycin, Anabeanopeptilide) oder Oxygenasen (Complestatin, Vancomycin) (40).

Glykosyl-Transferasen sind in der Regel spezifisch für einen, oft seltenen, Zucker, den sie an einer bestimmten Stelle O- oder C-glykosidisch mit dem Peptid verknüpfen (41). In der Regel arbeiten diese Enzyme nach der nichtribosomalen Synthese des Aglykons.

Die externen Oxygenasen sind für das sogenannte oxidative *cross-linking* bestimmter Aminosäurereste verantwortlich (40). Diese Enzyme zeigen Ähnlichkeiten zu Cytochrom P<sub>450</sub>-Typ Häm-Proteinen. Das *cross-linking* der Seitenketten führt dazu, daß das Produkt nicht mehr eine flexible Kette, sondern ein starres Gerüst ist. Bei Vancomycin ist dies von Bedeutung für die antibiotische Funktion, da nur das starre Produkt erfolgreich 5 Wasserstoffbrückenbindungen zu *N*-acyl-DAla-DAla-Bausteinen der Peptidoglykanschicht ausbilden kann, was zur Blockierung der Zellwandsynthese führt (42).

Bis vor kurzem wurde angenommen, daß diese Enzyme erst nach Freisetzung der Peptidkette vom NRPS-Templat aktiv werden. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß die Oxygenase OxyB des Vancomycin-Genclusters das freie Substrat Leu<sub>1</sub>-Tyr<sub>2</sub>-Asn<sub>3</sub>-Hpg<sub>4</sub>-Hpg<sub>5</sub>-Tyr<sub>6</sub>-S-NAC nicht akzeptierte. Beim PCP, das mit dem gleichen Peptid beladen wurde, konnte das oxidative *cross-linking* zwischen Hpg<sub>5</sub> und Tyr<sub>6</sub> gezeigt werden. Dies weist auf eine Aktivität der Oxygenase bereits während der Peptidsynthese an der wachsenden Kette hin (43).

### 2.1.8 Klassifizierung von NRPS

Generell kann man NRPS je nach Domänen- bzw. Modulzusammensetzung im Verhältnis zum Produkt in drei Gruppen unterteilen: Lineare NRPS (Typ A), iterative NRPS (Typ B) und nicht-lineare NRPS (Typ C) (5). Kennt man das Produkt einer NRPS, aber nicht diese selbst, so ist es bei der gezielten Suche wichtig, die richtige Klassifizierung zu wählen.

Die meisten bisher biochemisch charakterisierten NRPS gehören dem Typ A an, u.a. Surfactin, Bacitracin, Vancomycin oder Daptomycin. Hier entspricht die Anzahl der Module der Anzahl Aminosäuren im Produkt. Typischerweise ist eine solche NRPS mit  $n$  Bausteinen im Produkt nach dem Schema A-PCP-(C-A-PCP) <sub>$n-1$</sub> -Te aufgebaut, und ähnelt dadurch funktionell einem Fließband. Modifizierende Domänen können dabei in beliebigen Modulen enthalten sein; das Grundschema wird davon nicht beeinflusst.

Prominente Beispiele für Typ B NRPS sind Gramicidin S und Enniatin oder die Siderophore Bacillibactin und Enterobactin. Bei diesen iterativen NRPS werden bei der Biosynthese verschiedene Domänen oder Module mehrfach genutzt. Bei der Synthese von Gramicidin S zum Beispiel werden die fünf Module zur Produktbildung zweimal durchlaufen, wobei das erste Pentapeptid an die TE-Domäne gebunden wird und dort bleibt, bis die zweite Runde durchlaufen wurde. Dann wird das erste Pentapeptid mit dem zweiten von der TE-Domäne Kopf-zu-Schwanz zu einem Homodimer zyklisch verbunden.

Interessanterweise können Typ A und B NRPS bis heute nicht anhand ihrer Primärstruktur unterschieden werden, sondern erst durch die gemeinsame Betrachtung von NRPS und dem zugehörigen Produkt.

Zum dritten Typ C gehören alle diejenigen NRPS, die aufgrund ihrer ungewöhnlichen Domänen- oder Modulstruktur nicht zu den anderen beiden Typen gezählt werden

können, z.B. Syringomycin, Bleomycin oder die Siderophore Yersiniabactin und Vibriobactin.

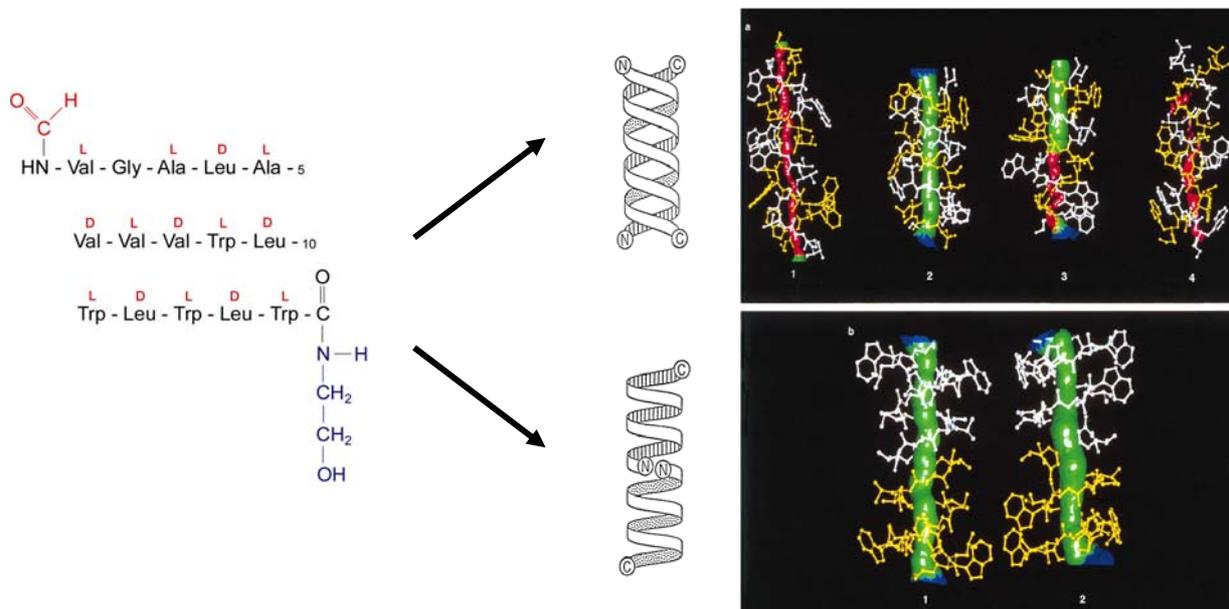
## 2.2 Lineares Gramicidin

Lineares Gramicidin wird von *Bacillus brevis* ATCC 8185 während der Sporulationsphase produziert (44). Das Polypeptid Gramicidin besteht aus 15 hydrophoben Aminosäuren mit alternierender L-D-Konfiguration. Die N-terminale AS Valin ist N-formyliert, und der C-Terminus ist durch Ethanolamin vor Abbau geschützt. Die Primärstruktur wurde bestimmt als Formyl-Val<sub>1</sub>-Gly<sub>2</sub>-Ala<sub>3</sub>-DLeu<sub>4</sub>-Ala<sub>5</sub>-DVal<sub>6</sub>-Val<sub>7</sub>-DVal<sub>8</sub>-Trp<sub>9</sub>-DLeu<sub>10</sub>-Trp<sub>11</sub>-DLeu<sub>12</sub>-Trp<sub>13</sub>-DLeu<sub>14</sub>-Trp<sub>15</sub>-Ethanolamin (45).

Es existieren zwei Isoformen, Gramicidin B (LTrp<sub>11</sub> → LPhe<sub>11</sub>) und Gramicidin C (LTrp<sub>11</sub> → LTyr<sub>11</sub>). Gramicidin D beschreibt die natürliche Mischung der Gramicidine A, B und C jeweils zu 80%, 5% und 15% (46). Bei allen drei Gramicidinen ABC wird in 5% der Fälle Isoleucin statt Valin an Position 1 gefunden (Isoleucin-Gramicidine; (45)).

Das Pentadekapeptid bildet eine  $\beta$ -Helix mit Ganghöhe 6,3 Å aus, wobei alle Reste nach außen zeigen und dadurch im Inneren eine Pore mit 3-4 Å Durchmesser gebildet wird. Zwei Moleküle Gramicidin bilden in Phospholipidmembranen einen Kopf-zu-Kopf-Dimer, der dort als Ionenkanal für einwertige Kationen agiert. Die Kationen können den Kanal unkontrolliert mit einer Geschwindigkeit ähnlich der von Diffusion in Wasser passieren, wodurch das Transmembranpotential der betroffenen Zelle rasch zusammenbricht ((47), s. Abb. 2-11). Es gibt auch sogenannte helikale Dimere, bei denen zwei Moleküle Gramicidin sich Helix-artig zusammenschließen und die Membran durchspannen. Diese Konformation scheint jedoch eher in lösemittelhaltigen Umgebungen als *in vivo* vorzukommen.

Der Biosyntheseweg für Gramicidin war zu Beginn dieser Arbeit noch nicht aufgeklärt. Aufgrund der Modifikationen am N- und C-Terminus sowie wegen der vielen D-Aminosäuren wurde vermutet, daß eine nichtribosomale Peptidsynthetase das Pentadekapeptid in *B. brevis* ATCC 8185 synthetisieren könnte.

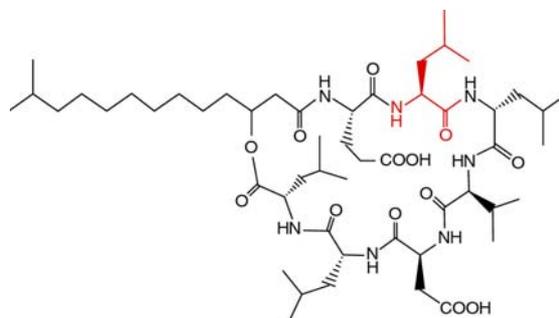


**Abbildung 2-11:**

Links, Primärstruktur von Gramicidin A. Rechts, schematische und strukturelle Darstellung. Rechts oben, helikaler Dimer. Rechts unten, Kopf-zu-Kopf-Dimer.

### 2.3 Surfactin

Surfactin ist ein zyklisches Lipoheptapeptid, welches von verschiedenen *Bacillus*-Spezies nichtribosomal produziert wird, u.a. von *Bacillus subtilis* ATCC 21332. Die Heptapeptidkette L<sub>Glu</sub><sub>1</sub>-L<sub>Leu</sub><sub>2</sub>-D<sub>Leu</sub><sub>3</sub>-L<sub>Val</sub><sub>4</sub>-L<sub>Asp</sub><sub>5</sub>-D<sub>Leu</sub><sub>6</sub>-L<sub>Leu</sub><sub>7</sub> trägt eine  $\beta$ -hydroxy-Fettsäure am C-Terminus, die mit der letzten Aminosäure durch eine Laktonbindung verbunden ist (s. Abb. 2-12). Das Peptid wirkt als Biotensid, das die Oberflächenspannung von Wasser herabsetzt, und wird als solches auch kommerziell verwendet. Surfactin zeichnet sich auch durch seine hämolytische Aktivität aus, die zur Lyse von Erythrozyten führt, so daß neben HPLC-MS auch Blutagarplatten zur Produktanalyse eingesetzt werden können.



**Abbildung 2-12:**

Struktur von Surfactin. Das für diese Arbeit wichtige Leucin an Position 2 ist rot markiert.

## 2.4 Aufgabenstellung

Die Aufgabenstellung für diese Arbeit ist in einen Haupt- und einen Nebenteil untergliedert.

Der Hauptteil beschäftigt sich mit der Fragestellung, wie das Peptidantibiotikum Gramacidin A von *Bacillus brevis* ATCC 8185 synthetisiert wird. In meiner Diplomarbeit konnte ein DNA-Stück mittels degenerierter PCR erhalten werden, das für ein Fragment einer bislang unbekanntes NRPS kodiert. Als Arbeitshypothese wurde angenommen, daß dieses zum Gencluster der Gramacidin-NRPS gehören könnte (48).

1. Es sollte zunächst die noch verbleibende Sequenzlücke innerhalb des DNA-Stücks geschlossen werden, und überprüft werden, ob das kodierte NRPS-Fragment weiterhin in das in der Diplomarbeit aufgestellte Modell paßt. Dieses Modell beschreibt die Domänenabfolge der putativen Gramacidin-NRPS.
2. Es sollte die komplette NRPS identifiziert, kloniert und sequenziert werden.
3. Die Identität der NRPS sollte dann durch biochemische Charakterisierung einzelner A-Domänen gezeigt werden.
4. Speziell die beiden Formyltransferase- und Reduktase- Domänen sollen untersucht werden, die bei der Gramacidin-NRPS vermutet wurden.

Im Nebenteil sollte die Strategie für Modulaustausche auf genetischer Ebene verbessert werden, z.B. durch positive Selektion oder durch Entwicklung einer alternativen Methode wie Ausloopen genetischer Elemente über homologe Rekombination.

## 3 Material

### 3.1 Geräte

Tabelle 3-1:

Verwendete Geräte, Hersteller und Typenbezeichnungen.

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller und Typenbezeichnung</b>
Autoklav	Tuttnauer 5075 ELV
Autom. DNA-Sequenzanalyse	PE Applied Biosystems ABI PRISM 310 Genetic Analyzer
Chromatographiesäulen	Amersham Biosciences Superdex 75
Dokumentation von DNA-Agarosegelen	Videokamera Cybertech CS 1, Thermodrucker Mitsubishi Video Copy Processor
Elektroporationssystem	Biorad Gene Pulser II
FPLC-System	Pharmacia ÄKTA Prime
HPLC-MS-System	Hewlett Packard Series 1100 HPLC-System mit DAD-Detektor, Vakuumentgaser, quaternärer Pumpe, Autosampler und HP Chemstation-Software
HPLC-Trennsäulen	Macherey & Nagel, Nucleosil 120/3 250 3 C18, 250/2-Nucleodur-C18-Pyramid
Hybridisierungsöfen	Bachhofer Hybridisierungsöfen Mini 38
Luftschüttler	New Brunswick Scientific Series 25 Incubator Shaker, New Brunswick Scientific Innova 4300 Incubator Shaker
MALDI-TOF	Bruker Flex III MALDI-TOF Massenspektrometer
MS/MS-System	Applied Biosystems, API QStar Pulsar I
Peptidsynthese	Advanced ChemTech APEX 396 synthesizer
Photometer	Pharmacia Ultrospec 3000 UV/Visible Spectrophotometer
Sartorius	20 mL Vivaspin Konzentratoren
Schüttelinkubator	Eppendorf Thermomixer Comfort
Software	Lasergene DNASTar 5.0 (GATC), Clone Manager 5 (Scientific and educational Software), Sigma Plot 8.0 mit Enzymkinetik-Modul (SPSS), ChemDraw Std 9.0 (Cambridge Soft)
Speed-Vac	Uniequip Univapo 150 H
Szintillationszähler	Packard 1900CA TRI-CARB Liquid Scintillation Analyzer
Thermocycler	Eppendorf Mastercycler Personal
UV-Inkubator	Stratagene Stratalinker UV Crosslinker Model 1800
Wasserbad	Infors Aquatron Rundschüttelmaschine
Wasserentionisierer	Seral Serapur Pro 90 CN
Zellaufschluß	Sim Aminco French Pressure Cell Press, Avestin Emulsiflex C5
Zentrifugen	Heraeus Mikrofuge pico, Minifuge RF, Sorvall RC 26 Plus, Sorvall RC 5B Plus, Eppendorf 5415 D

### 3.2 Enzyme und Chemikalien

Alle in Tabelle 3-2 nicht aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Aldrich (Steinheim), Sigma (Deisenhofen) oder Merck (Darmstadt) in p.a.-Qualität bezogen.

**Tabelle 3-2:**

Verwendete Chemikalien.

<b>Hersteller</b>	<b>Produkt(e)</b>
ABI (Foster City, USA)	ABI Prism™ dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit
Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)	Hybond N <sup>+</sup> -Nylonmembran, IPTG, Ampicillin, RNase A, Kanamycin, Chloramphenicol, Lysozym, Proteinase K
Bachem (Weil am Rhein)	N <sub>α</sub> -Fmoc- und N <sub>α</sub> -Boc-geschützte Aminosäuren
Difco (Detroit, USA)	Hefeextrakt, Casamino acids
Epicentre	CopyControl Fosmid Library Production Kit
Eurogentec (Seraing, Belgien)	Agarose, Elektroporationsküvetten
Fluka (Neu-Ulm)	SDS, TEMED, DMF
Gibco (Eggenstein)	Acrylamid, Bisacrylamid, 10kDa-Proteinleiter
Hartmann-Analytik (Braunschweig)	[ <sup>14</sup> C]-markierte Aminosäuren
ICN-Biomedicals, Inc. (Eschwege)	[ <sup>14</sup> C]-markierte Aminosäuren
Invitrogen (Karlsruhe)	pCR-XL-TOPO und pBAD directional TOPO cloning Kit
Kodak (Rochester, USA)	Röntgenfilm Biomaxx MR
Millipore (Molsheim)	Sterilfilter (0.22 μm), Nitrocellulosefilter (0.025 μM)
MWG Biotech (Eberberg)	Oligonukleotide
NEN (Köln)	[ <sup>32</sup> P]-Pyrophosphat
New England Biolabs (Schwalbach)	dNTPs, Restriktionsendonukleasen, DNA- und Proteinmarker, DNA-modifizierende Enzyme
Novabiochem (Darmstadt)	N <sub>α</sub> -Fmoc- und N <sub>α</sub> -Boc-geschützte Aminosäuren, HBTU, HATU, HOBT, PyBop, 2-Chlorotrityl-Harz
Oxoid (Wesel)	Agar Nr. 1, Trypton, Blutagarplatten
Qiagen (Hilden)	tip20- und tip-100 Anionentauschersäulen, Genomic TIP Anionentauschersäulen G100, QIAquick-spin PCR purification kit, QIAEX II Kit, Ni <sup>2+</sup> -NTA-Agarose
Qiagen-Operon (Köln)	Oligonukleotide
Roche (Mannheim)	Expand™ Long Template PCR System
Roth (Karlsruhe)	Ethidiumbromid, Ethanol, Methanol, Isopropanol, Rotizint Eco Plus, β-Mercaptoethanol
Schleicher & Schüll (Dassel)	Whatmann-3MM Papier
Serva (Heidelberg)	Bromphenolblau, Tween 20, APS

### 3.3 Mikroorganismen

**Tabelle 3-3:**

In dieser Arbeit verwendete Mikroorganismen.

Mikro-organismus	Stamm	Genotyp/Phänotyp	Literatur / Quelle
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 21332	Wildtyp-Stamm	(49)
<i>B. subtilis</i>	AS10	<i>B. subtilis</i> ATCC 21332 $\Delta$ <i>srfAA</i> <sub>2</sub> :: <i>cat</i>	(50)
<i>Bacillus brevis</i>	ATCC 8185	Wildtyp-Stamm	(51)
<i>E. coli</i>	XL1 - blue	F'(Tn 10( <i>tet</i> <sup>R</sup> ) <i>proAB lacI</i> <sup>q</sup> <i>lacZ</i> M15), <i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17</i> ( <i>r</i> <sub>k</sub> <sup>-</sup> <i>m</i> <sub>k</sub> <sup>+</sup> ), <i>supE44, relA1 lac</i>	Stratagene
<i>E. coli</i>	BL21	<i>E. coli</i> B, F <sup>-</sup> , <i>ompT, hsdS</i> ( <i>r</i> <sub>B</sub> - <i>m</i> <sub>B</sub> -), <i>gal, dcm</i>	Stratagene
<i>E. coli</i>	GM48	<i>ara dam dcm galk galT leu supE44</i> <i>thi-1 thr tonA tsx</i>	Stratagene

### 3.4 Medien

Die folgenden Medien wurden zur Anzucht von *E. coli*, *B. subtilis* und *B. brevis* verwendet:

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

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

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

Nach dem Autoklavieren wurden je 600 mL Medium jeweils 1 mL der folgenden Lösungen zugesetzt:

Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	1 M
MnCl <sub>2</sub>	0,1 M
FeSO <sub>4</sub>	1 mM

Zum Herstellen von Agarplatten wurden die Medien vor dem Autoklavieren mit 1,5 % (w/v) Agar Nr. 1 versetzt. Zur Sterilisation wurden alle Lösungen und Medium vor dem Gebrauch 20 min bei 121 °C und 1,5 bar autoklaviert. Hitzeempfindliche Substanzen wie z.B. Antibiotika wurden den Medien als sterilfiltrierte Lösungen bei einer Temperatur von ca. 50 °C in folgenden Endkonzentrationen zugesetzt:

<b>Antibiotikum</b>	<b>Endkonzentration</b>	
Ampicillin	100	µg/mL
Chloramphenicol	2 bis 20	µg/mL
Kanamycin	50	µg/mL
Neomycin	15	µg/mL
5-Fluorouracil	20	µg/mL

## 4 Methoden

Die Mehrheit der in dieser Studie verwendeten Methoden sind Standardmethoden und wurden bereits ausführlich beschrieben (52). Daher werden im Folgenden nur neue oder verändert durchgeführte Methoden beschrieben. Alle in dieser Studie verwendeten Oligonukleotide sind im Anhang aufgelistet.

### 4.1 Plasmid-DNA-Isolierung für Sequenzierexperimente

Wurde Plasmid-DNA für Sequenzierungsexperimente benötigt, wurden diese mit dem QIAquick-spin plasmid purification Kit aus *E. coli* präpariert gemäß der Anleitung des Herstellers. Die so erhaltene DNA war von hoher Reinheit und konnte ohne weitere Behandlung für Sequenzierexperimente verwendet werden.

### 4.2 Klonierung mit den TOPO-Vektoren von *Invitrogen*

#### 4.2.1 pCR-XL-TOPO

Es wurde das pCR-XL-TOPO-Kit von *Invitrogen* zur Zwischenklonierung von DNA-Fragmenten mit 3'-Adenin-Überhang verwendet. DNA-Fragmente zur Klonierung in pCR-XL-TOPO wurden mit dem Expand™ Long Template PCR Kit amplifiziert. Danach wurden sie über ein 0,8 %iges DNA-Agarosegel unter Verwendung der Qiagen-Produkte Quick Spin PCR Purification Kit (Fragmente <3 kb) oder QIAEX II (Fragmente >3 kb) aufgereinigt. Anschließend wurden die Klonierung in pCR-XL-TOPO und Transformation in *E. coli* Top10 gemäß der Anleitung des Herstellers durchgeführt.

Der Vektor besitzt einen ColE1 Replikationsursprung und ist ein Derivat des pUC-Vektors. Er wird von *Invitrogen* fertig geschnitten geliefert, und an beiden 5'-Enden ist das Enzym Topoisomerase I aus dem *Vaccinia*-Virus kovalent gebunden. Somit ist die Bindungsenergie des geschnittenen DNA-Rückgrats konserviert und wird zur Bildung einer neuen Bindung zwischen dem Vektor und dem einzufügenden DNA-Stück genutzt.

Beim pCR-XL Vektor ist keine gerichtete Klonierung eines DNA-Stückes möglich, da die 3'-Überhänge an jedem Ende nur aus einer Base, Adenin, bestehen. Dieser Vektor wurde nicht zur Expression verwendet, sondern nur zur erleichterten Klonierung von PCR-Fragmenten ohne Schnittstellen bzw. zur Zwischenklonierung von PCR-Produkten zur weiteren Klonierung. Aus diesem Grunde besitzt der Vektor

auch keinen Expressionregulator. Die Selektion erfolgt bei diesem Vektor über eine Kanamycin-Resistenz.

#### 4.2.2 pBAD202

Die PCR und Klonierung der gewünschten Gene mit dem pBAD *directional cloning* TOPO Kit geschah nach Anleitung des Herstellers, ebenso die Ableitung der für die PCR benötigten Primer. DNA-Fragmente wurden wie unter 4.2.1 beschrieben aufgereinigt und gemäß der Anleitung in pBAD202 kloniert und in *E. coli* Top10 transformiert.

Der von *Invitrogen* gelieferte pBAD202-Vektor gehört ebenfalls zur pUC-Familie und besitzt einen ColE1-Replikationsursprung. Er ermöglicht die Expression von Proteinen, die am C-Terminus eine His<sub>6</sub>-Fusion und am N-Terminus eine Thioredoxin-Fusion tragen. Die His<sub>6</sub>-Fusion dient zur Markierung des Proteins und zur Aufreinigung mittels Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitätschromatographie, während die Thioredoxin-Fusion dem rekombinanten Protein eine bessere Löslichkeit verleiht. Die Expression steht unter Kontrolle des *araBAD* Promoter-Systems. Bei Zugabe von Arabinose bildet diese einen Komplex mit dem *araC*-Genprodukt und wandelt dieses so von einem Dimer (Repressor der AraBAD-Expression) in ein Monomer (Promoter der AraBAD-Expression) um. Für eine effektive Expression von AraBAD ist außerdem die Bindung eines CAP (*catabolite gene activator protein*)-cAMP-Komplexes an seine Bindungsstelle im Arabinoseoperon nötig. Die Expression wird durch Glukose unterdrückt, wodurch dieses Operon sehr stringent reguliert ist. Zur Selektion besitzt der Vektor eine Kanamycin-Resistenzkassette. Der Vektor wird von *Invitrogen* fertig geschnitten geliefert, mit einem 4 bp - 3'-Überhang an einer Seite, um mit entsprechend aufgebauten Primern eine gerichtete Klonierung des Inserts zu ermöglichen.

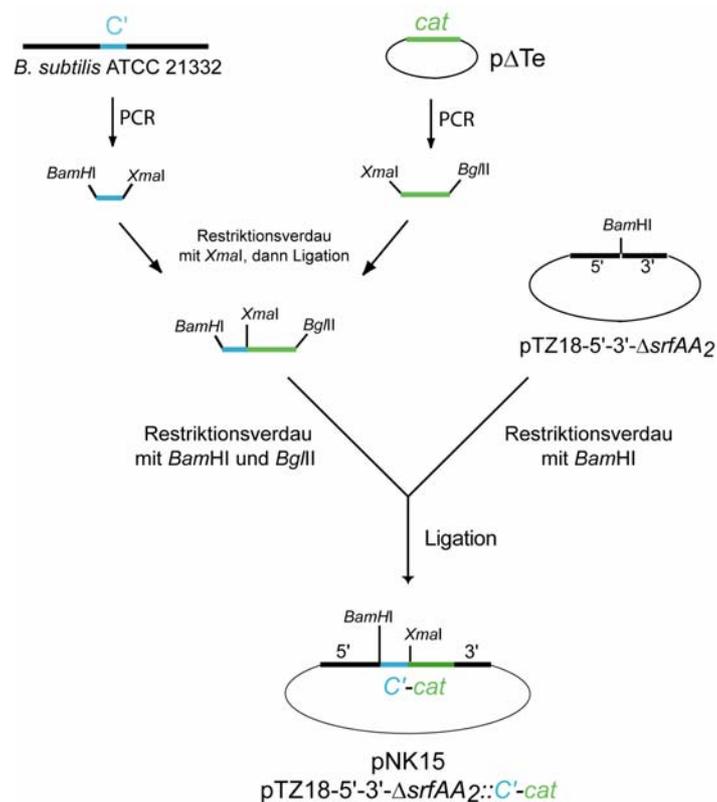
#### 4.3 Klonierung von pNK15

Die Chloramphenicol-Resistenz *cat* wurde mit den Primern NK114 und NK116 vom Plasmid pΔTe (53) amplifiziert. Dabei wurde am 5'-Ende des DNA-Fragments eine *Xma*I-Schnittstelle, und am 3'-Ende eine *Bgl*II-Schnittstelle jeweils durch die Primer eingefügt. Das 300 bp-große Fragment der C-Domäne von Modul 3 wurde mit den Primern NK113 und HM55 von der genomischen DNA von *B. subtilis* ATCC 21332 amplifiziert. Dabei wurde am 5'-Ende eine *Bam*HI-Schnittstelle und am 3'-Ende eine *Xma*I-Schnittstelle jeweils durch die Primer eingeführt. Beide Fragmente wurden über

QIAquick spin PCR purification-Säulchen aufgereinigt und mit *Xma*I geschnitten. Nach erneuter Aufreinigung und einer Ligrationsreaktion ü.N. beider Fragmente wurde mit den Primern HM55 und NK116 das neu erhaltene Fragment *C'*-*cat* zur weiteren Klonierung per PCR amplifiziert.

Das PCR-Produkt wurde mit *Bgl*II und *Bam*HI verdaut und mit dem *Bam*HI-geschnittenen Vektor pTZ18-5'-3'- $\Delta$ *srfAA2* ligiert.

Nach Transformation in *E. coli* XL1 blue und Selektion auf Amp<sup>100</sup> Cm<sup>5</sup> konnten Kolonien erhalten werden. Nach Plasmidpräparation und Kontrollverdauen (richtige Orientierung des Inserts) wurde der Vektor pNK15 (pTZ18-5'-3'- $\Delta$ *srfAA2*::*C'*-*cat*) erhalten. Sequenzierexperimente bestätigten die korrekte Klonierung. Die komplette Strategie zur Generierung von pNK15 ist in Abb. 4-1 dargestellt.



**Abbildung 4-1:**

Klonierungsstrategie zur Generierung des Austauschvektors pNK15 (pTZ18-5'-3'- $\Delta$ *srfAA2*::*C'*-*cat*).

#### 4.4 Isolation von genomischer DNA

Die genomische DNA von *Bacillus brevis* ATCC 8185 wurde isoliert und gereinigt mit Hilfe des Genomic-tip 100/G-Kits gemäß der Anleitung des Herstellers. Auf diese Art und Weise konnte genomische DNA mit sehr großen Fragmenten und hoher Reinheit

erhalten werden, die für die Generierung der Genbank und als Templat für PCR-Reaktion bestens geeignet war.

#### 4.5 Inverse PCR

10 µg genomische DNA von *B. brevis* ATCC 8185 wurde ü.N. bei 37 °C mit 10 U PstI in einem Gesamtvolumen von 20 µL verdaut. Am nächsten Tag wurde die Probe auf drei Aliquots aufgeteilt (2, 5 und 13 µL) und ü.N. bei 16 °C nach Zugabe von 400 U T4 DNA-Ligase religiert. Dabei wurden die Volumina angepaßt auf 20, 20 und 30 µL. Von jedem Ansatz wurde 1 µL als Templat in einer PCR mit den Primern NK20 und NK53 bzw. NK20 und NK54 eingesetzt. Die Annealing-Temperatur wurde dabei wie folgt angepaßt: 10 Zyklen 57 °C -0,2 °C je Zyklus, danach 20 Zyklen 55 °C -0,1 °C je Zyklus. Das erhaltenene DNA-Fragment mit etwa 5,5-6 kb Größe wurden über ein 0,8 %iges Agarosegel mit QIAEX II aufgereinigt, die Ansätze wurden vereinigt und in pCR-XL-TOPO (s. 4.2.1) kloniert.

#### 4.6 Herstellung der Fosmid-Genbank

Die Fosmidgenbank der genomischen DNA von *B. brevis* ATCC 8185 wurde mit dem CopyControl Fosmid Library Production Kit generiert. Dabei wurde nach Anleitung des Herstellers gearbeitet mit der Ausnahme, daß die 4fache Menge DNA eingesetzt wurde. Die genomische DNA wurde durch 10 s Vortexieren auf die Größe von 20 – 40 kb geschert; dies wurde durch *pulse field* Gelelektrophorese kontrolliert.

#### 4.7 Überproduktion von Proteinen

Bei Testexpressionen wurden 4 mL LB-Medium (mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt) mit einer ÜNK 1:100 inokuliert. Bei  $OD_{600} \sim 0,5 - 0,6$  wurden die Zellen mit 0,5 mM IPTG (pQE- und pET-Derivate) bzw. 0,01% Arabinose (pBAD-Derivate) induziert (Endkonzentration). 3 h nach Induktion wurden Vollzellextrakte hergestellt und mit SDS-PAGEs auf induzierte Proteinbanden untersucht.

Bei präparativen Ansätzen wurde wie bei Testexpressionen verfahren mit dem Unterschied, daß üblicherweise 5 L LB-Medium (10 3L-Kolben à 500 mL) verwendet wurden. 3 – 4 h nach Induktion wurde die gesamte Kultur abzentrifugiert (10 min, 9.000 upm, 4 °C) und in 10 mL Hepes A je L Kultur resuspendiert.

#### 4.8 Proteinreinigung mittels Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitätschromatographie

Zur Reinigung von His<sub>6</sub>-tag-Proteinen mittels Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitätschromatographie an der ÄKTA Prime wurden die folgenden Puffer verwendet:

Hepes A 50 mM Hepes, 300 mM NaCl, pH 8,0

Hepes B 50 mM Hepes, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 8,0

Der Gradient war wie folgt für die Aufreinigung aus 1 L *E. coli* – Kultur (bei größeren Kulturen wurde der Intervall nach Beginn des Auftrags entsprechend verlängert):

Gesamtvolumen [mL]	% B	Flußrate [mL/min]	Fraktionsgröße [mL]
0	100	1	-
4	0	1	-
9	0	0,5	5 mL
50	0	0,5	5 mL
50,1	10	1	2,5 mL
65	10	1	1,5 mL
80	100	1	1,5 mL
100	100	1	-
120	0	1	-

Im Intervall zwischen 9 und 50 wurde die Probe vom Superloop auf die Ni<sup>2+</sup>-NTA-Säule aufgetragen (*inject*-Modus).

Die einzelnen Fraktionen wurden via SDS-PAGE kontrolliert und die Fraktionen mit gereinigtem Protein wurden vereinigt.

Alle Proteine wurden mit Vivaspin 20 mL Konzentratoren ankonzentriert; je nach Proteingröße wurde dabei die Membran mit passender Ausschlußgröße gewählt.

#### 4.9 ATP-PPi-Austausch

Die Substratspezifität der nichtribosomalen Peptidsynthese wird determiniert durch die Adenylierungsreaktion, in der kognate Aminosäuren unter ATP-Verbrauch und Pyrophosphat-Abspaltung adenyliert werden. Diese Reaktion ist reversibel; sie wird ausgenutzt, um Aminosäure-aktivierende Eigenschaften der A-Domäne zu verfolgen. Wird die A-Domäne in Gegenwart ihrer Substrate Aminosäure und ATP sowie dem Kofaktor Mg<sup>2+</sup> inkubiert und dem Ansatz geringe Mengen an [<sup>32</sup>P]-PP<sub>i</sub> zugesetzt, so führt die Rückreaktion zur Bildung von radioaktiv markiertem ATP. Die Reaktion wird durch einen Aktivkohle-haltigen Mix abgestoppt, der zur selektiven Absorption des ATPs führt. Die Inkorporation von [<sup>32</sup>P]-markierten ATP in dem präzipitierten Aktivkohle-Niederschlag in Abhängigkeit der zugehörigen Substrat-Aminosäure kann

somit als Maß für die Aktivität der A-Domäne gelten. Da die ATP/PP<sub>i</sub>-Austauschreaktion die Rückreaktion verfolgt (die Hydrolyse des Adenylats), kann diese Reaktion kein direktes Maß für die Verfügbarkeit des Adenylats darstellen. Allerdings ist die Menge der in ATP eingebauten Radioaktivität proportional zur ATP/PP<sub>i</sub>-Austauschrate und somit zur spezifischen aminosäureaktivierenden Eigenschaft der Enzymprobe. Blindwerte können in Reaktionsansätzen ohne zugesetzte Aminosäure beziehungsweise ohne ATP bestimmt werden.

Der Assay enthält die folgenden Bestandteile: 50 pM Enzym, 1 mM Aminosäure, 4 mM ATP, 0,2 mM PP<sub>i</sub>, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,15 µCi [<sup>32</sup>P]-PP<sub>i</sub> in 100 µL HEPES A.

In 1,5 mL-Eppendorffreaktionsgefäßen wurden jeweils die zu testenden Aminosäuren vorgelegt. Die übrigen Bestandteile der Reaktion wurden separat vermischt und dann zur jeweiligen Aminosäure aliquotiert, wodurch die Reaktion gestartet wurde. Die Ansätze wurden für 10 min bei 37 °C inkubiert, bevor die Reaktionen durch Zugabe von 500 µL Terminationslösung (100 mM Natriumpyrophosphat, 560 mM Perchlorsäure, 1,2 % (w/v) Aktivkohle Norit A) abgestoppt wurden. Der Ansatz wurde vortexiert und die Aktivkohle durch Zentrifugation für 1 min bei 13.000 upm und RT pelletiert. Das Pellet wurde zweimal mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und in 500 µL Wasser aufgenommen. Nach Überführung des Ansatzes in ein mit 3,5 mL Szintillationsflüssigkeit Rotiszint Eco Plus befülltes Szintillationsröhrchen wurden die Zählraten der Proben in einem Szintillationszähler gemessen.

#### 4.10 Beladungsassay

Um die Beladung von PCP-Domänen zu untersuchen, können diese mit einer radioaktiv markierten Aminosäure beladen und nach anschließender Fällung durch Zählung des radioaktiven Zerfalls quantifiziert werden. Dieses ist möglich, wenn die Aminosäure vorher durch eine A-Domäne aktiviert worden ist. Da die PCP-Domänen in *apo*-Form isoliert worden sind, war es zunächst nötig, sie in die *holo*-Form zu konvertieren. Dazu wurden sie mit CoA in Gegenwart von Sfp aus *Bacillus subtilis* inkubiert, um den 4'-Ppant-Kofaktor auf den konservierten Serinrest des PCPs zu übertragen. Ein typischer Reaktionsmix setzte sich wie folgt zusammen: 0,2 nmol Enzym, 1 mM CoA, 500 nM Sfp, 10 mM MgCl<sub>2</sub> in 96 µL Dialysepuffer.

Der Mix wurde zusammenpipettiert und 30 min bei RT inkubiert. Dann wurden 2 µL <sup>14</sup>C-markierte Aminosäure hinzugegeben sowie 2 µL einer 100 mM ATP-Lösung (Endkonzentration: 2 mM). Für jede Aminosäure wurde eine Negativkontrolle, in der das ATP durch 2 µL Puffer ersetzt wurde, durchgeführt. Die Reaktionsmischung

wurde bei 37 °C unter leichtem Schütteln (300 upm) für 15 Minuten inkubiert und das Protein dann durch Zugabe von 20 µL 2,5 %iger (w/v) BSA-Lösung, 500 µL 10 %iger (v/v) TCA-Lösung gefällt, wobei das zugesetzte BSA zur Visualisierung des Pellets diente. Der Niederschlag wurde nach 30 min Inkubation auf Eis durch Zentrifugation (13000 upm, 30 min, 4°C) pelletiert und das Zentrifugat abgesaugt. Das Pellet wurde einmal mit 500 µL 10 %iger (v/v) TCA-Lösung gewaschen und schließlich in 200 µL Ameisensäure aufgenommen. Nach Überführung in ein mit 3,5 mL Szintillationsflüssigkeit Rotiszint Eco Plus gefülltes Szintillationsröhrchen wurde die Zählrate in einem Szintillationszähler gemessen. Mit Hilfe der spezifischen und der molaren Radioaktivität konnte dann die Beladung der PCP-Domäne in Prozent errechnet werden.

#### 4.11 Reduktase-Assay

Das gereinigte PCP-R Enzym wurde gegen Dialysepuffer (5 mM Hepes, 5 mM NaCl, pH 7) dialysiert. Der Assay enthielt die folgenden Bestandteile: 60 µM Enzym, 5 µM Sfp, 100 µM Peptidyl-CoA-Substrat, 300 µM NADPH, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 µM MnCl<sub>2</sub>. Das Volumen wurde auf 100 µL angepaßt mit Assaypuffer (20 mM Hepes, 50 mM NaCl, pH 6). Bei den Negativkontrollen wurde entweder Enzym, Sfp, Peptidyl-CoA-Substrat oder NADPH weggelassen. Der Assay wurde bei 25 °C für 30 min inkubiert. Danach wurde die Reaktion mit 1 mL MeOH abgestoppt, 30 min auf Eis inkubiert und anschließend 30 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde bei 30 °C 4 h lang in der SpeedVac entfernt. Das Pellet wurde in 100 µL 50 % MeOH, 0,05 % HCOOH resuspendiert.

#### 4.12 Analyse der Reduktase-Assays mit HPLC-MS

Die aufgearbeiteten Reduktase-Assays (4.9) wurden mit einer HPLC-Anlage, die an ein 1100 MSD-A ESI-Quadupol Massenspektrometer gekoppelt war, analysiert. Die Proben (je 95 µL) wurden auf eine 250/2-Nucleodur-C18-Pyramid Säule mit 5 µM Partikeldurchmesser aufgetragen. Der Gradient aus den Lösungen A (bdH<sub>2</sub>O, 0,05% HCOOH) und B (Acetonitril, 0,045% HCOOH) war wie folgt:

15% B - 70% B	40 min
70% B – 95% B	5 min
95% B	5 min

Die Flußrate betrug 0,3 mL/min bei einer Säulentemperatur von 50 °C. Die UV-Detektion wurde bei 215 nm durchgeführt.

Die MSD Parameter wurden festgesetzt auf: Massenbereich von 650 amu bis 850 amu im positiven Ionenmodus, *gain* 3,0 und Fragmentor 60. Der Gasfluß (N<sub>2</sub>) betrug 13 L/min, nebulizer Druck 30 psig, Gastemperatur 350 °C und Spannung der Kapillaren 4.300 V.

#### 4.13 Peptidyl-CoA-Synthese

Festphasen-Peptidsynthese wurde mit Hilfe eines Advanced ChemTech APEX 396 Synthesizer wie zuvor beschrieben durchgeführt (0,1 mmol je Ansatz; (54)). Standardmäßig wurden 2-Chlorotriethyl-Harz und N<sub>α</sub>-F<sub>moc</sub>-geschützte Aminosäuren zur Synthese verwendet.

Zur Peptidyl-CoA-Synthese wurden 25 µMol Peptide eingesetzt. Dazu wurden 1 eq CoA, 4 eq K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> und 1,5 eq PyBop in 2 mL 50 % THF gegeben und 4 h bei RT geschüttelt. Danach wurde die Reaktion in flüssigem N<sub>2</sub> schockgefroren und ü.N. lyophilisiert. Die Entschützung der Seitengruppen wurde in 95 % TFA, 2,5 % TIPS und 2,5 % H<sub>2</sub>O für 3 h bei RT unter Rühren durchgeführt. Im Anschluß wurde das Reaktionsgemisch in 30 mL eiskaltem Diethylether gefällt und 5 min bei 4.000 upm / 4 °C pelletiert. Das Pellet wurde je nach Löslichkeit des Substrates in 20 – 35 % MeCN gelöst und mittels eines Agilent 1100 präparativen HPLC-Systems aufgereinigt. Die gereinigten Substrate wurden durch MALDI-TOF Massenspektrometrie überprüft und ü.N. lyophilisiert. Die Substrate wurden in DMSO gelöst (Endkonzentration: 10 mM).

#### 4.14 Photometrischer Reduktase-Assay

Der Assay wurde bei 340 nm durchgeführt, da NADPH bei 340 nm im Gegensatz zur oxidierten Form NADP<sup>+</sup> absorbiert. Dadurch kann die Umsetzung von NADPH im Photometer beobachtet werden.

Der Assay setzte sich wie folgt zusammen: 30 µM PCP-R, 2,5 µM Sfp, 50 µM Peptidyl-CoA-Substrat, 150 µM NADPH, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 µM MnCl<sub>2</sub>. Das Volumen wurde mit Puffer (50 mM HEPES, 50 mM NaCl, pH 6) auf 200 µL angepaßt. Zunächst wurde ohne PCP-R und NADPH ein Nullabgleich durchgeführt. Nach Zugabe von NADPH wurde abgewartet, bis der Wert sich nicht mehr änderte (typischerweise 5 – 15 min). Durch Zugabe von PCP-R und gründlichem Mischen wurde der Assay gestartet. Zeitpunkte wurden bis zum stabilen Erreichen des Plateaus gemessen. Bei

der Negativkontrolle wurden Substrat und Sfp weggelassen. Die erhaltenen  $\Delta E$ -Werte wurden mit einer zuvor erstellten Kalibrierungsgeraden (0 – 200  $\mu\text{M}$  NADPH) verglichen zur Bestimmung des NADPH-Verbrauchs.

## 4.15 Synthese des Aldehyd-Substrates

### 4.15.1 Strategie 1

Zunächst wurden 30 mL wasserfreies Methanol 5 min mit HCl gesättigt. Dann wurden 80 mg Peptid in einem Rundkolben sekuriert und die 30 mL MeOH/HCl zugegeben und ü.N. bei RT gerührt.

Es wurden 54 mg des Methylesters (74  $\mu\text{mol}$ ) erhalten und in 11,8 mL wasserfreiem THF gelöst. 653  $\mu\text{L}$  DIBAL-H wurden in 9 mL THF verdünnt, so daß 1 mL dieser Lösung 74  $\mu\text{mol}$  (1 eq) entspricht.

Die Reduktion wurde zunächst 2 Stunden bei  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  unter tropfenweiser Zugabe von 1 eq DIBAL-H versucht. Die Analyse einer Probe mit MALDI-TOF zeigte jedoch keine Veränderung des Spektrums. Es wurden weitere 5 eq DIBAL über 2 Stunden zugegeben, und anschließend sogar die Temperatur langsam auf RT erhöht.

Es wurden in 30 minütigen Abständen Proben zur Analyse entnommen per MALDI-TOF. Es entstand zunehmend ein neues Peak im Spektrum. Die Masse dieses Peaks entsprach aber nicht der des gewünschten Aldehyds ( $\text{M}+\text{H}^+$  700,2) oder des Alkohols ( $\text{M}+\text{H}^+$  702,2), sondern wahrscheinlich dem des an der N-terminalen Acetylgruppe reduzierten Methylesters (beobachtet:  $\text{M}+\text{H}^+$  716, errechnet  $\text{M}+\text{H}^+$  716,2). Diese beobachtete Masse entspricht theoretisch auch der des hydrolysierten Methylesters; dies ist jedoch chemisch gesehen sehr unwahrscheinlich, da in wasserfreiem Milieu unter reduzierenden Bedingungen gearbeitet wurde.

### 4.15.2 Strategie 2

Zur Festphasenpeptidsynthese wurde statt 2-Chlorotriptyl-Harz das Weinrebamid-Harz verwendet, so daß das synthetisierte Peptid als Weinrebamid aktiviert an das Harz gebunden wird. Das Produkt der Peptidsynthese wurde in THF abs. gequollen und es wurde zunächst 1 eq DIBAL bei  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  langsam zugegeben. Da nach 2 Stunden keine Veränderung des MALDI-TOF Spektrums beobachtet werden konnte, wurden weitere 5 eq DIBAL über 2 Stunden langsam zugegeben und anschließend die Temperatur langsam auf RT erhöht. Dieses Mal konnte gar keine Änderung des Spektrums beobachtet werden, was wahrscheinlich bedeutet, daß auch das

Weinreb-Amid keine geeignete Abgangsgruppe für die Reduktionsreaktion ist, d.h. daß kein Produkt vom Harz „herunterreduziert“ werden konnte.

### 4.15.3 Strategie 3

Zunächst das Peptid ohne das C-terminale Glycin synthetisiert wurde und anschließend Aminoacetaldehyd-Aminoacetal an dieses gekuppelt werden sollte. Danach sollte in 1:1 (v/v) THF / H<sub>2</sub>O mit 0,2 M HCl ü.N. die Acetalrückreaktion zum gewünschten Aldehyd erzwungen werden.

Die Kupplung des Aminoacetaldehyd-Diethylacetals an das Tetrapeptid mit Standardmethoden wurde durch Zugabe von HATU und HOBT durchgeführt. Die Reaktion wurde 3 h bei RT geschüttelt, und eine Probe wurde mit MALDI-TOF analysiert. Diese zeigte die gewünschte Kupplung, da nur noch Produkt, jedoch kein Tetrapeptid mehr nachweisbar war. Nach Einengung der Reaktion am Rotationsverdampfer wurde das Intermediat in 1:1 (v/v) THF/H<sub>2</sub>O mit 0,2 M HCl gelöst, wozu die Reaktion allerdings auf 50°C erhöht werden mußte. Bei RT war das Substrat zum größten Teil unlöslich und es konnte auch nach mehreren Stunden Rühren keine Veränderung der entnommenen Proben im MALDI-TOF Spektrum beobachtet werden. Nach Erhöhung auf 50 °C wurde die Rückreaktion ü.N. gerührt. Das Spektrum zeigte danach einen Peak mit der gewünschten Masse des Aldehyds. Nach erneuter Einengung der Reaktion am Rotationsverdampfer und Lösen in 2 mL 20% Acetonitril wurde versucht, den Aldehyd mittels präparativer HPLC zu isolieren. Die anschließende Untersuchung aller bei der Aufreinigung erhaltenen Fraktionen ergab aber keine Fraktion mit Aldehyd. Eine Probe der Reaktion war parallel zur versuchten Aufreinigung mittels analytischer HPLC untersucht worden. Es konnte auch hier kein Peak mit der Masse des Aldehyds gefunden werden, jedoch war ein deutlicher Peak mit der Masse des Alkohols vorhanden.

### 4.16 Synthese von N<sup>10</sup>-formyl-Tetrahydrofolat

Nach Ansetzen der THF-Stammlösung (5mM) wurde diese 15 min mit Argon anaerobisiert und anschließend unter Lichtausschluß bei -20°C gelagert.

Der Assay zum photometrischen Nachweis der N<sup>10</sup>-formylTHF-Synthese enthielt: 4,3 µM FoID, 800 µM NAD<sup>+</sup>, 50 µM THF, 10 mM CH<sub>2</sub>O in 1 mL Kaliumphosphatpuffer pH 6,0 (vorgewärmt auf 37°C). Die Produktbildung konnte durch den Anstieg der Extinktion bei 340 nm im Photometer beobachtet werden.

Der Syntheseassay zum Einsatz in den Formyltransferaseassay (s. 4.17) enthielt:

43  $\mu\text{M}$  FoID, 8 mM  $\text{NAD}^+$ , 500  $\mu\text{M}$  THF, 100 mM  $\text{CH}_2\text{O}$  in 1 mL Kaliumphosphatpuffer pH 6,0, wobei  $^{14}\text{C}$ -markiertes  $\text{CH}_2\text{O}$  verwendet wurde. Der Assay wurde für 5 min bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert.

#### 4.17 Formyltransferaseassay

Zunächst wurde der Beladungsassay mit dem Modul LgrA1 wie folgt durchgeführt: 10  $\mu\text{M}$  LgrA1, 1 mM CoA, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 500 nM Sfp wurden in 100  $\mu\text{L}$  Hepes A 30 min bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Nach Zugabe von 2 mM ATP und 2 mM Valin wurde für weitere 15 min inkubiert. Danach wurden 100  $\mu\text{L}$  des  $\text{N}^{10}$ -formylITHF-Syntheseassays zugegeben und für weitere 15 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 500  $\mu\text{L}$  10 % TFA und 20  $\mu\text{L}$  2,5% BSA-Lösung abgestoppt und 30 min bei  $4^\circ\text{C}$  inkubiert. Nach 15 minütiger Zentrifugation bei 13.000 upm wurde der Überstand abgenommen und das Pellet mit 500  $\mu\text{L}$  10 % TFA gewaschen. Das Pellet wurde zum Schluß in 200  $\mu\text{L}$   $\text{HCOOH}$  aufgenommen. Nach Überführung in ein mit 3,5 mL Szintillationsflüssigkeit Rotiszint Eco Plus gefülltes Szintillationsröhrchen wurde die Zählrate in einem Szintillationszähler gemessen.

## 5 Ergebnisse - Biosynthese von Gramicidin A

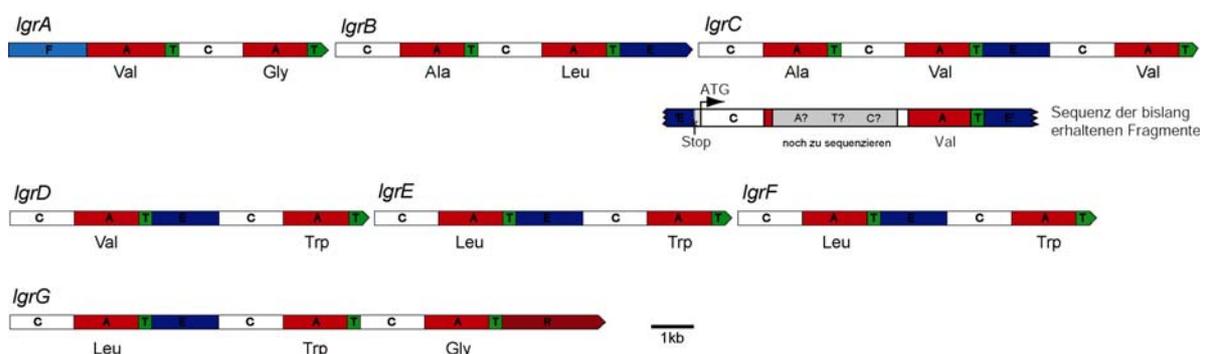
### 5.1 Der *Igr* - Gencluster

#### 5.1.1 Identifizierung und Sequenzierung der *Lgr* – Synthetasen

Während meiner Diplomarbeit wurde durch Kombination mehrerer Techniken ein etwa 7,8 kb – großes DNA-Fragment identifiziert, daß für einen Teil einer bis dahin unbekannten nichtribosomalen Peptidsynthetase kodierte (48). Es schien sehr wahrscheinlich, daß dieses Fragment ein Teil der gesuchten NRPS für Gramicidin A war, da es in das aufgestellte Modell der Gramicidin-NRPS paßte (s. Abb. 5-1). Dieses Modell wurde auf der Annahme basiert, daß die Gramicidin-NRPS zum Typ A (lineare NRPS) gehört. Für jede Aminosäure (AS) im Produkt wurde ein Modul postuliert. Modulen, die für den Einbau einer D-Aminosäure verantwortlich sind, wurde eine E-Domäne hinzugefügt. Am N-Terminus wurde eine putative F-Domäne eingefügt, und am C-Terminus wurde ein 16. Modul mit einer Reduktase-Domäne eingefügt.

Im Rahmen der Diplomarbeit war es aus zeitlichen Gründen nicht möglich, das ganze Fragment zu sequenzieren, so daß im ersten Drittel eine Sequenzlücke von etwa 2.000 bp verblieben war.

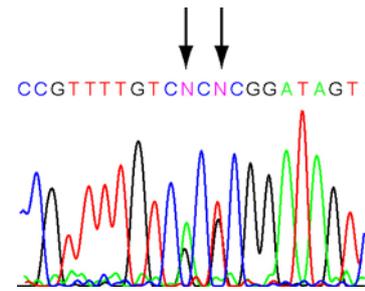
Bei den ersten Versuchen, die noch verbleibende zweite A-Domäne zu sequenzieren, wurde eine irritierende Beobachtung gemacht (s. Abb. 5-2): Die Sequenzierexperimente waren durchschnittlich alle 5 bis 15 Basenpaare nicht eindeutig, d. h. es überlagerten sich zwei Signale, wohingegen der Rest der Sequenz eindeutig und ohne Überlagerungen war. Dies lag an der hohen Sequenzidentität mit



**Abbildung 5-1:**

Das Modell der Gramicidin-NRPS aus der Diplomarbeit mit dem 7,8 kb-Fragment.

der ersten A-Domäne, welche im Nachhinein mit 91% bestimmt werden konnte (innerhalb eines 1.265 Basenpaar-Abschnitts). Die Sequenzierprimer konnten so an zwei unterschiedlichen Stellen auf der Templat-DNA binden, und die geringen Unterschiede in der Sequenz beider Domänen machten sich durch das Vorhandensein dieser nicht eindeutigen Peaks bemerkbar. Eine Erhöhung der Annealing-Temperatur brachte keine Verbesserung der Spezifität der Primer.



**Abbildung 5-2:**

Ausschnitt eines Sequenzierexperimentes der verbleibenden zweiten A-Domäne.

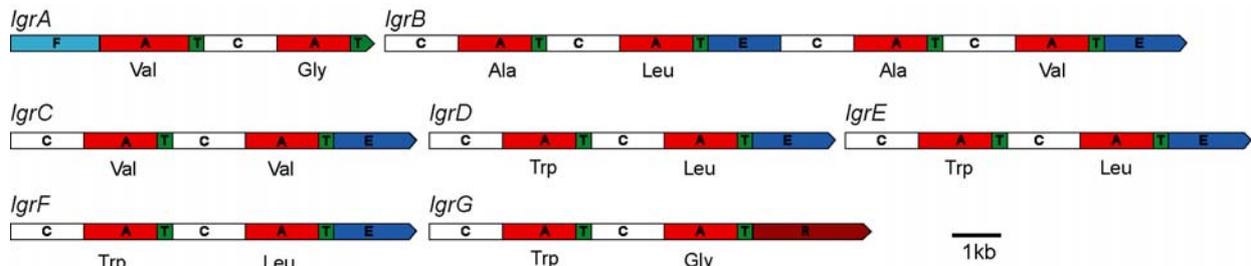
Auch war es bei 91% Sequenzidentität nicht möglich, einen Primer abzuleiten, der nur für die zweite A-Domäne spezifisch wäre. Die Lösung für dieses Problem war eine Umklonierung der zweiten A-Domäne in einen anderen Vektor. Mit Hilfe zweier Primer, die jeweils in der 5' bzw. 3' angrenzenden Region der A-Domäne lagen (hier konnte keine hinderliche DNA-Sequenzidentität mehr festgestellt werden) wurde diese mittels PCR amplifiziert und in pCR-XL-TOPO kloniert (Ergebnis: „pCR-XL-TOPO-Fragment3“). Im Folgenden konnte durch Sequenzierexperimente die Lücke in der Sequenz geschlossen werden. Die Vorhersage der A-Domänenspezifität über die 10 konservierten Reste der Substratbindetasche war identisch mit der ersten gefundenen A-Domäne (siehe Diplomarbeit) und ergab Valin. Dies paßte nicht zum aufgestellten Modell, da diese A-Domäne für Alanin spezifisch sein sollte (s. Abb. 5-1).

Es waren drei Schlußfolgerungen möglich:

1. Das Modell aus der Diplomarbeit (s. Abb. 5-1) ist ungenau und muß überarbeitet werden.
2. Es handelt sich nicht um die Biosynthesegene für Gramicidin A.
3. Die Spezifitätsvorhersage stimmt in diesem Fall nicht.

Es sprachen einige Punkte für die erste Möglichkeit.

Zum einen sollte im Produkt der bisher sequenzierten NRPS das Element dXaa – LVal – dVal vorkommen, was bei Gramicidin A der Fall ist. Zum anderen wurden bei der Größenbestimmung der putativen Gramicidin-NRPS mittels Ultrazentrifugation 1977 die drei Tyrocin-Synthetasen als Größenstandards verwendet (55). Da die damals angenommenen Größen von TycA, TycB und TycC aber falsch waren und

**Abbildung 5-3:**

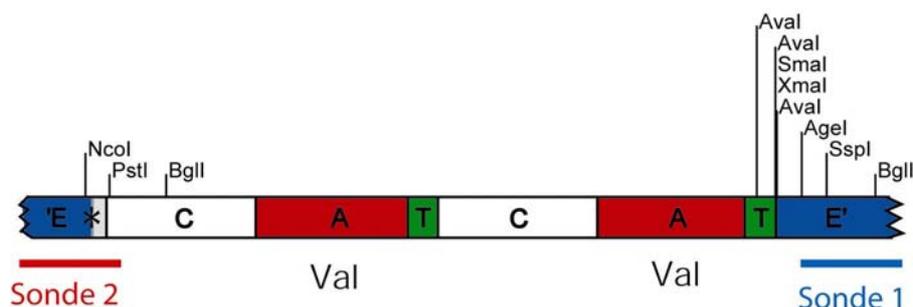
Das überarbeitete Modell der Gramicidin-NRPS.

Akers *et al.* rechneten, daß 70 kDa einem Modul entsprechen, wurde postuliert, daß LgrB aus 5 Modulen bestehen müsse. Durch Nachrechnen mit den heute bekannten Größen der Tyrocidinsynthetasen sowie der aktuellen Annahme, daß ein CAT-Modul durchschnittlich 110 kDa sowie ein CATE-Modul durchschnittlich sogar 190 kDa hat, wurde es sehr wahrscheinlich, daß LgrB tatsächlich nur aus 4 Modulen besteht. In diesem Fall paßt das 7,8 kb-Fragment genau in das überarbeitete Modell (s. Abb. 5-3).

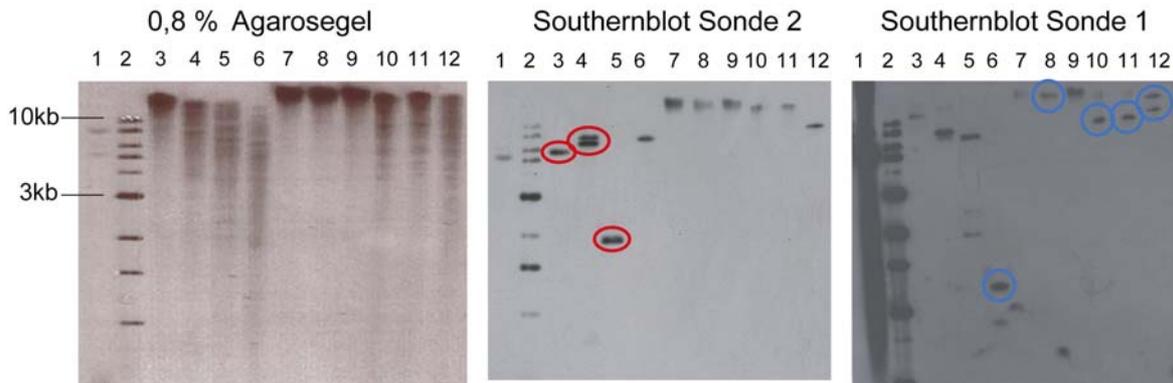
Um dennoch Gewißheit zu erhalten, daß es sich tatsächlich um die Biosynthesegene für Gramicidin A handelt, wurde ein weiteres Experiment beschlossen. Mit Hilfe einer Genomkartierung und anschließend einer inversen PCR sollte ein weiterer angrenzender DNA-Bereich kloniert und sequenziert werden, so daß die Sequenz von mindestens einer weiteren A-Domäne vorliegen würde.

### 5.1.2 Genomkartierung und inverse PCR

Für die Genomkartierung wurden die Schnittstellen so ausgewählt, daß diese jeweils etwa 1.000-1.500 bp vom 5' bzw. 3'-Ende des Fragments entfernt lagen. Für den 5'-Bereich wurden *Bgl*I, *Pst*I und *Nco*I gewählt, für den 3'-Bereich *Age*I, *Ssp*I, *Ava*I und *Sma*I bzw. *Xma*I (letztere haben die gleiche Erkennungssequenz) ausgewählt (s. Abb. 5-4). Als Kontrollen besonders mit Hinblick auf die Generierung einer Genbank im Erfolgsfalle wurden *Eco*RI und *Bam*HI ausgewählt, da diese

**Abbildung 5-4:**

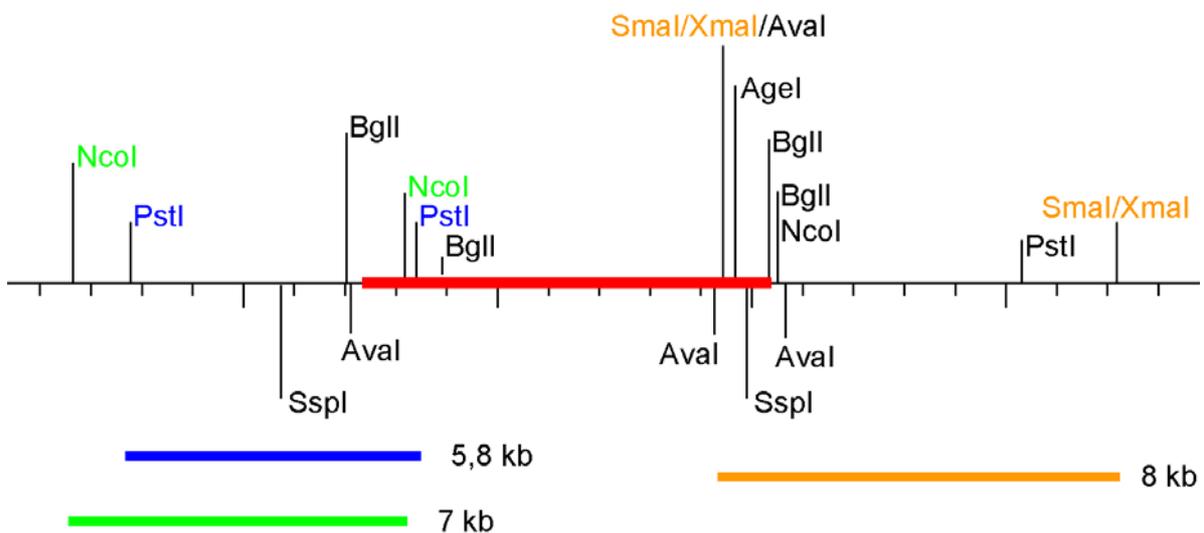
Position der Erkennungssequenzen innerhalb des 7,8 kb-Fragments der verwendeten Restriktionsendonukleasen sowie der beiden im Southernblot verwendeten Sonden.



**Abbildung 5-5:**

Links, Agarosegel mit der genomischen DNA von *B. brevis* ATCC 8185 nach Restriktionsverdau. Mitte, Southernblot nach Hybridisierung mit Sonde 2. Rechts, Southernblot nach Hybridisierung mit Sonde 1. Die jeweils wichtigen Banden sind markiert.

Spuren: 1 – Kontrolle; 2 – 1 kb-Marker; 3 – PstI; 4 – NcoI; 5 – BglI; 6 – Aval; 7 – BamHI; 8 – AgeI; 9 – EcoRI; 10 – SmaI; 11 – XmaI; 12 – SspI.



**Abbildung 5-6:**

Restriktionskarte des *up-* und *downstream* liegenden Bereichs des 7,8 kb-Fragments. Rot, 7,8 kb-Fragment. 1 Einheit auf der Skala entspricht 1 kb.

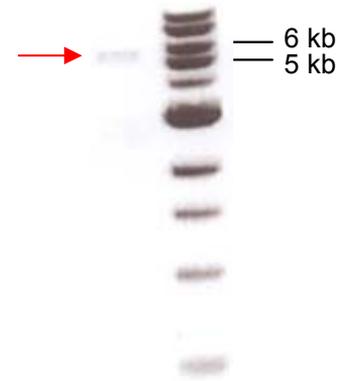
Restriktionsenzyme nicht im bislang bekannten und sequenzierten Bereich von etwa 30 kb aus *Bacillus brevis* schneiden und somit nur wenige Erkennungssequenzen im Genom existieren könnten.

Sonde 1 wurde mit den Primern NK6 und NK11 hergestellt (723 bp), Sonde 2 wurde durch Restriktionsverdau von pCR-XL-TOPO-Fragment3 mit *Bam*HI und *Bgl*I erhalten (1.290 bp). Der Southernblot wurde zunächst mit Sonde 2 durchgeführt. Anschließend wurde Sonde 2 heruntergewaschen und die Membran wurde dann mit Sonde 1 hybridisiert. Die erhaltenen Bandenmuster konnten zu einer Karte zusammengefügt werden (s. Abb. 5-5 und 5-6). Doppelte Banden im Southernblot

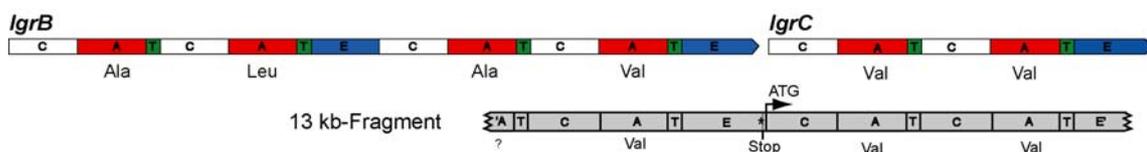
entstanden dadurch, daß die entsprechende Restriktionsendonuklease innerhalb der Sequenz der Sonde lag, so daß diese mit zwei Fragmenten hybridisieren konnte.

Aufgrund dieser Karte wurden drei günstige Fragmente ausgewählt: *NcoI* (~ 7 kb), *PstI* (~ 5,8 kb) und *XmaI/SmaI* (~ 8 kb). In jedem Fall sollten eine oder sogar zwei neue A-Domänen gefunden werden können. Die inverse PCR (siehe 4.5) wurde zunächst mit zwei Primerkombinationen, NK20 mit NK53 sowie NK20 mit NK54, mit *PstI* versucht und gelang mit der Kombination NK20 mit NK53 (s. Abb. 5-7). Die erhaltene Bande wurde aus einem 0,8%igen Agarose-Gel isoliert und in pCR-XL-TOPO kloniert (Ergebnis: „pCR-XL-TOPO-Fragment4“).

Sequenzierexperimente mit den Standardprimern des Vektors bestätigten die Identität des neuen Fragmentes. Anschließend wurde es mittels Primer-Walking von der Firma Qiagen sequenziert. Die Sequenz wurde der bereits bekannten hinzugefügt, so daß nun ein lückenloses 13 kb-Fragment vorlag, das für eine NRPS mit 'ATCATE-Stop Start-CATCATE' kodierte. Die Substratspezifität der ersten A-Domäne konnte mit Alanin lediglich vermutet werden, da die Sequenz erst ab Core A5 vorlag und somit nicht aller Reste des Spezifitätscodes bestimmt werden konnten. Die Spezifität der zweiten neuen A-Domäne konnte mit Valin vorhergesagt werden. Somit sollte im Produkt dieser NRPS das Element LAla(?) – DVal – LVal – DVal zu finden sein, was bei Gramicidin A der Fall ist. Die Identität der unbekanntenen NRPS als Teil der Gramicidin-Biosynthese schien gesichert zu sein, wie aus Abb. 5-8 ersichtlich wird.



**Abbildung 5-7:**  
Ergebnis der inversen PCR.



**Abbildung 5-8:**

Ausschnitt des Modells der Gramicidin-NRPS mit eingepaßtem 13 kb-Fragment.

### 5.1.3 Fosmid - Genbank

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde nun eine Genbank mit Hilfe des Epicentre CopyControl™ Fosmid Library Production Kit generiert. Dieses Kit wurde aus zwei Überlegungen heraus gewählt. Zum einen erfolgt die Einbringung der Genbank in die *E. coli* EPI 300-Wirtszellen mittels Phagentransfektion, wodurch auf eine Mindestinsertgröße selektiert wird; auch ist die Transfektionseffizienz sehr hoch. Beides ist bei BAC-Genbanken (*bacterial artificial chromosome*) nicht der Fall. Zum anderen wird die chromosomale DNA manuell geschert (durch vortexieren oder auf- und abpipettieren) und anschließend werden mittels eines Enzyms glatte DNA-Enden generiert. Die entstehenden Inserts werden dann in den Vektor, der ebenfalls glatte DNA-Enden besitzt, ligiert. Somit entfällt ein mühseliger partieller Verdau z.B. mit *SauIII*A, der für einige andere Kits notwendig ist. Bei diesen ist dieser Partialverdau ein entscheidender Faktor für die Qualität der Genbank (Insertgröße), und kann auch der limitierende Schritt der Methode sein.

Zur Vereinfachung werden im Nachfolgenden die A-Domänen des 13 kb-Fragments entsprechend ihrer Zuordnung im Modell AlaA5, ValA6, ValA7 und ValA8 genannt.

Die Genbank wurde nach Anleitung des Herstellers generiert mit der Ausnahme, daß die vierfache Menge an chromosomaler DNA eingesetzt wurde. Nach der Transfektion der *E. coli* EPI 300 Zellen wurden ~1.500 CFUs (kolonienformende Einheiten) erhalten.

Nach der folgenden Formel wurde errechnet, wie viele Klone die Genbank bei einer bestimmten Insertgröße umfassen muß, um zu gewährleisten, daß ein bestimmtes DNA-Fragment enthalten ist:  $N = \ln(1-P) / \ln(1-f)$ . Dabei ist  $N$  die Anzahl der benötigten Klone,  $P$  die gewünschte Wahrscheinlichkeit und  $f$  der Quotient aus Größe des gesuchten DNA-Fragments und Größe des Genoms. Konkret wurde berechnet, wie viele Klone nötig sind, um mit 99%iger Wahrscheinlichkeit eine Sequenz aus dem Genom von *Bacillus subtilis* (4,2 Mbp) zu erhalten, wenn die Insertgröße 40 kb beträgt:

$$N = \frac{\ln(1-0,99)}{\ln\left(1 - \frac{4 \times 10^4 \text{ Basen}}{4,2 \times 10^6 \text{ Basen}}\right)} = \frac{-4,605}{-0,0095} = 483$$

Es wurde angenommen, daß die Größe des Genoms von *Bacillus brevis* ATCC 8185 in etwa der des Genoms von *Bacillus subtilis* MR168 entspricht. Es wurden 700 Klone ausgewählt und durch Kolonien-Southernblot untersucht. Die Sonde für den

5'-Bereich (Sonde B) wurde aus einem DNA-Fragment hergestellt, welches durch Restriktionsverdau von pCR-XL-TOPO-Fragment4 mit *EcoRI* und *DraIII* und anschließender Aufreinigung über ein Agarosegel erhalten wurde (2.870 bp). Als Sonde A (3'-Bereich) wurde Sonde 1 von der Genomkartierung wiederverwendet.

Beim ersten Screen der 700 Kolonien mit Sonde B wurden zwei etwas stärkere und 4 sehr schwache Signale erhalten. Die Membranen wurden anschließend gewaschen und mit Sonde A hybridisiert. Dabei wurden 5 sehr schwache Signale erhalten. Aus den entsprechenden Kolonien wurden dann die Fosmide präpariert und die Inserts von beiden Seiten ansequenziert. Dabei erwiesen sich nur die beiden stärkeren Signale von Sonde B als richtig.

Die Sequenz des Inserts von Fosmid 4-21 begann mitten im 13 kb-Fragment (A-Domäne ValA7) und endete in einem ORF, der für eine putative Reduktase kodierte, die mit den Reduktasen der Polyketidsynthesen hohe Sequenzähnlichkeit hatte. Das Insert von Fosmid 7-9 begann etwa 3 kb nach Fosmid 4-21 (in A-Domäne ValA8) und endete in einem ORF, der anhand von Sequenzvergleichen einem ABC-Transporter zugeordnet werden konnte. Beide Fosmide überlappten offensichtlich, wobei Fosmid 7-9 wahrscheinlich den kompletten 3'-Bereich der gesuchten NRPS enthielt, wohingegen Fosmid 4-21 genau in der letzten postulierten Domäne, einer Reduktase, zu enden schien.

Es wurden weitere 500 Kolonien der Genbank auf Membranen „umgepickt“ und mit Sonde A gescreent. Dieses Mal wurden ebenfalls zwei stärkere Signale erhalten. Nach Präparation der Fosmide 1.2-33 und 2.2-34 wurden die Inserts ansequenziert. Fosmid 2.2-34 begann in einer bislang unbekannten E-Domäne und endete in einer bislang ebenfalls unbekannten C-Domäne. Das zweite Fosmid, 1.2-33, begann in einem ORF, der laut Sequenzanalyse der Thiaminbiosynthese zuzuordnen war, und endete mitten im bekannten Bereich des 13 kb-Fragments. Somit schien der gesuchte 5'-Bereich der NRPS auf Fosmid 1.2-33 zu liegen, wohingegen Fosmid 2.2-34 ungünstig den mittleren Bereich der gesuchten NRPS abzudecken schien.

Die beiden richtigen Fosmide, 7-9 und 1.2-33, wurden von der Firma Qiagen per Shotgun-Sequencing in Publikationsqualität sequenziert. Die Abdeckung war dabei 13fach für Fosmid 7-9 und 16fach für Fosmid 1.2-33, so daß die Sequenzgenauigkeit >99,99% ist. Die Insertgröße betrug 35.099 bp für Fosmid 1.2-33 und 34.481 bp für Fosmid 7-9. Die Fosmide überlappten nicht, und die Lücke von 4.292 bp zwischen beiden wurde durch das zuvor sequenzierte 13 kb-Fragment abgedeckt.

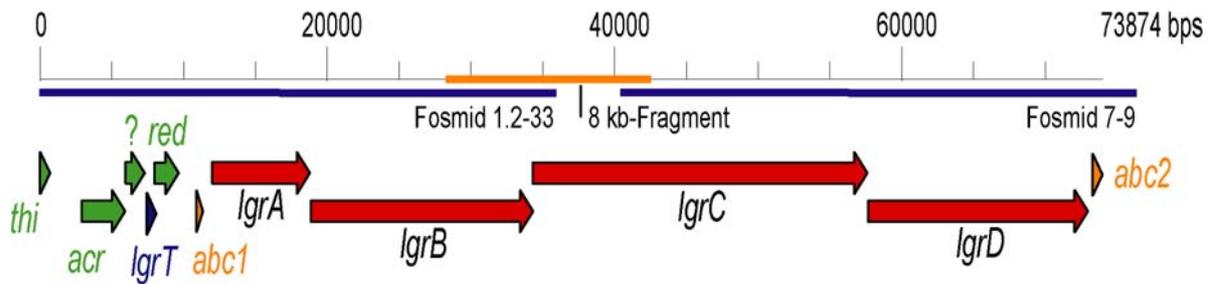


Abbildung 5-9:

Darstellung der 11 signifikanten ORFs innerhalb der sequenzierten 73.874 bp.

#### 5.1.4 Analyse der *lgr* - Region

Insgesamt lagen nun 73.872 bp genetische Information vor, die bei GenBank im Internet mit der Zugangsnummer AJ566197 deponiert wurden. Eine Suche mit der BlastX-Funktion der NCBI-Homepage ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/\(56\)](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/(56))) ergab 11 signifikante Treffer für mögliche ORFs innerhalb der 74 kb; diese sind in Tabelle 5-1 und Abb. 5-9 dargestellt.

Tabelle 5-1:

<u>Gen</u>	<u>Vermutete Funktion (BLAST-Vergleiche)</u>	<u>von bp bis bp</u>
<i>thi</i>	Thiamin – Biosynthese	1 – 700
<i>acr</i>	Acriflavin – Resistenz	2.894 – 5.923
?	unbekannt	5.944 – 7.278
<i>lgrT</i>	Typ II Thioesterase	7.439 – 8.090
<i>red</i>	Familie der Aldo – / Ketoreduktasen	7.946 – 9.647
<i>abc1</i>	ATP-bindende Untereinheit eines ABC-Transporters	11.277 – 11.723
<i>lgrA</i>	NRPS	11.972 – 18.766
<i>lgrB</i>	NRPS	18.837 – 34.283
<i>lgrC</i>	NRPS	34.258 – 57.528
<i>lgrD</i>	NRPS	57.604 – 72.861
<i>abc2</i>	ABC-Transporter	73.190 – 73.872

Nach *in silico*-Translation der vier ORFs *lgrA*, *lgrB*, *lgrC* und *lgrD* konnten insgesamt 16 A-Domänen, 16 PCPs, 15 C-Domänen, 7 E-Domänen sowie eine R-Domäne identifiziert werden. Der ersten A-Domäne geht ein Bereich von etwa 200 AS voraus, der nach Sequenzvergleichen die Funktion einer putativen N-Formyltransferase besitzt. Insgesamt ergab die Analyse der vier ORFs, daß 56 Domänen in 16 Modulen so organisiert vorlagen, wie es für eine lineare NRPS zu erwarten ist (schematische Übersicht s. Abb. 5-10).

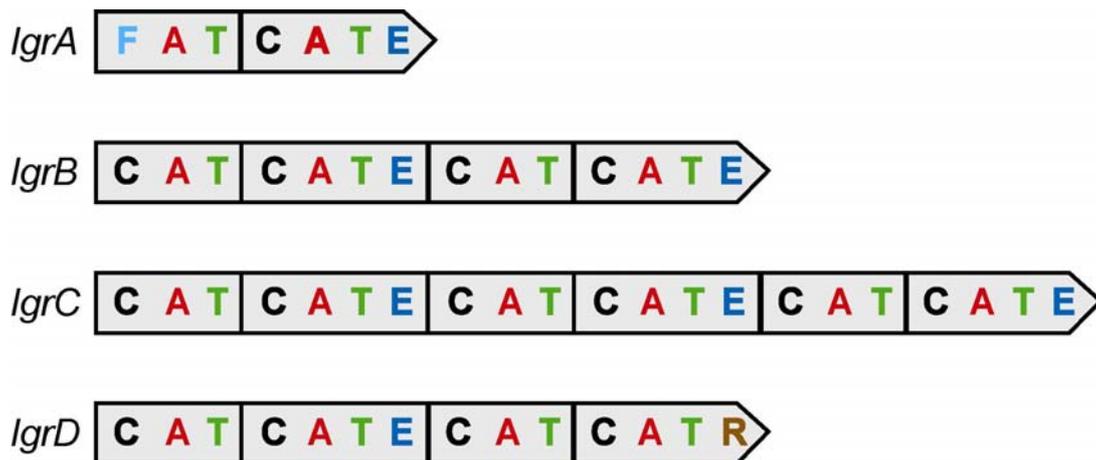


Abbildung 5-10:

Schematische Übersicht der 56 Domänen kodiert von den 4 NRPS-Genen *lgrABCD*.

### 5.1.5 Die A-Domänen

Zunächst wurden die 16 A-Domänen mit der PheA-Domäne aus dem Gramicidin S-Operon in einem Alignment verglichen, um die 10 Aminosäuren der Substratbindetasche zu identifizieren (1, 7). Diese Reste, der sogenannte Spezifitätscode, wurden dann mit ca. 200 anderen Spezifitätscodes von bereits charakterisierten A-Domänen verglichen. Dabei zeigte sich, daß die Vorhersage für die Lgr-A-Domänen befriedigend mit der laut Produktsequenz zu erwartenden Aktivierung übereinstimmte (siehe Tabelle 5-2).

Der phylogenetische Baum, der nach einem Alignment der 16 Spezifitätscodes erstellt wurde, zeigte eine eindeutige Übereinstimmung zwischen vorhergesagten und erwarteten aktivierten Aminosäuren (siehe Abb. 5-11).

Um dies durch biochemische Experimente zu bestätigen, wurden die ersten drei Module, LgrA1 (104 kDa), LgrA2 (135 kDa) und LgrB1 ( kDa), jeweils kloniert, in *E. coli* überproduziert und gereinigt (LgrB1 wurde in Zusammenarbeit mit Holger Schuhmann im Rahmen dessen Diplomarbeit untersucht; (57)). Zunächst wurde die Aktivität der A-Domänen getestet. LgrA1 aktivierte Valin (100%), Isoleucin (48%) und nebenspezifisch Leucin (12%) im Test, wobei der  $K_m$ -Wert für Valin (0,8 mM) besser war als der für Isoleucin (2,4 mM). Für Leucin wurde kein  $K_m$ -Wert ermittelt, da bei den kinetischen Untersuchungen selbst bei 20 mM Substrat noch nicht der Sättigungsbereich erreicht war. Dies weist auf einen sehr hohen  $K_m$ -Wert für Leucin hin.

	PheA-Nummerierung										Aminosäure	
	235	236	239	278	299	301	322	330	331	517	Vorhersage	Produkt
LgrA1	D	G	L	Y	I	G	G	I	M	K	Leu/Val/Ile	Val/Ile
LgrA2	D	I	A	N	L	C	I	I	Y	K	Cys/Gly?	Gly
LgrA3	D	V	A	N	F	A	I	I	Y	K	Cys/Gly?	Ala
LgrA4	D	A	W	F	L	G	Q	V	V	K	Leu	Leu
LgrA5	D	L	Y	P	N	A	L	T	Y	K	Cys/Arg/Pro?	Ala
LgrA6	D	A	F	W	L	G	G	T	F	K	Val	Val
LgrA7	D	A	F	W	L	G	G	T	F	K	Val	Val
LgrA8	D	A	F	W	L	G	G	T	F	K	Val	Val
LgrA9	D	V	S	S	I	G	C	V	C	K	Lys?	Trp
LgrA10	D	A	W	F	L	G	Q	V	V	K	Leu	Leu
LgrA11	D	V	S	A	I	G	C	V	T	K	Lys?	Trp/Phe/Tyr
LgrA12	D	A	W	F	L	G	Q	V	V	K	Leu	Leu
LgrA13	D	V	S	S	I	G	C	V	C	K	Lys?	Trp
LgrA14	D	A	W	F	L	G	Q	V	V	K	Leu	Leu
LgrA15	D	V	S	S	E	G	C	V	G	K	Lys?	Trp
LgrA16	D	L	Y	T	I	A	L	V	Y	K	Cys /Gly?	Gly

Tabelle 5-2:

Die 10 Aminosäure-Reste des Spezifitätscodes; Nummerierung gemäß der jeweiligen Position in der Kristallstruktur von PheA (1). Vorhersage, AS bestimmt durch Datenbankvergleiche. Produkt, AS bestimmt durch Vorkommen in Gramicidin mit Isoformen. Übereinstimmungen sind grau markiert.

LgrA2 aktivierte ausschließlich Glycin, und LgrB1 aktivierte Glycin und Alanin (100% und 51%), wobei der  $K_m$ -Wert für Alanin mit 1,5 mM etwas besser war als der  $K_m$ -Wert für Glycin mit 2,2 mM (s. Abb. 5-12; (57)).

Für LgrA1 wurde auch die Beladung des PCPs mit den drei kognaten Aminosäuren untersucht. Alle drei Aminosäuren wurden *in vitro* mit fast gleicher Effizienz auf das PCP beladen, nämlich mit 13,6%.

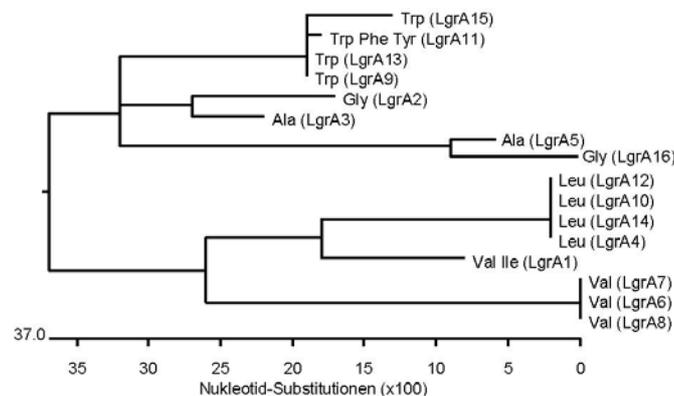
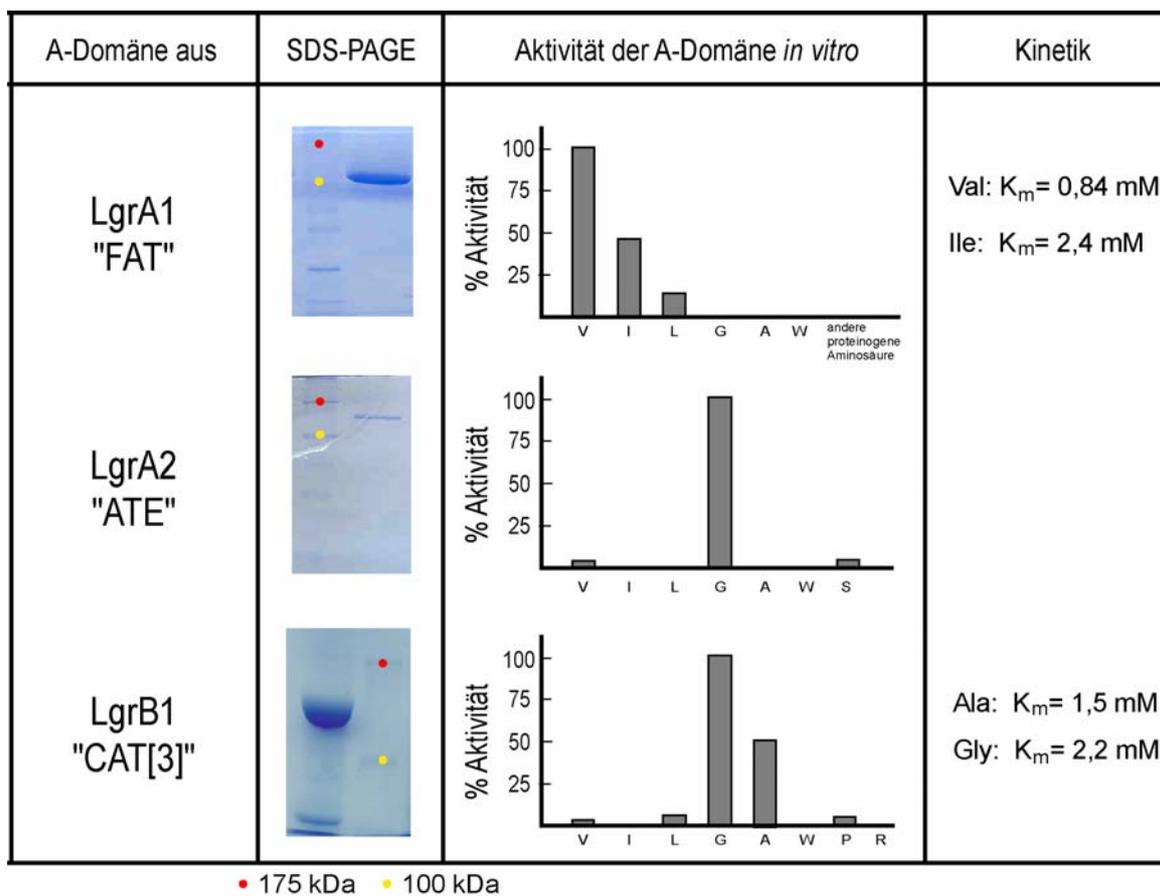


Abbildung 5-11:

Nach einem Alignment der Spezifitätscodes erstellter phylogenetischer Baum.



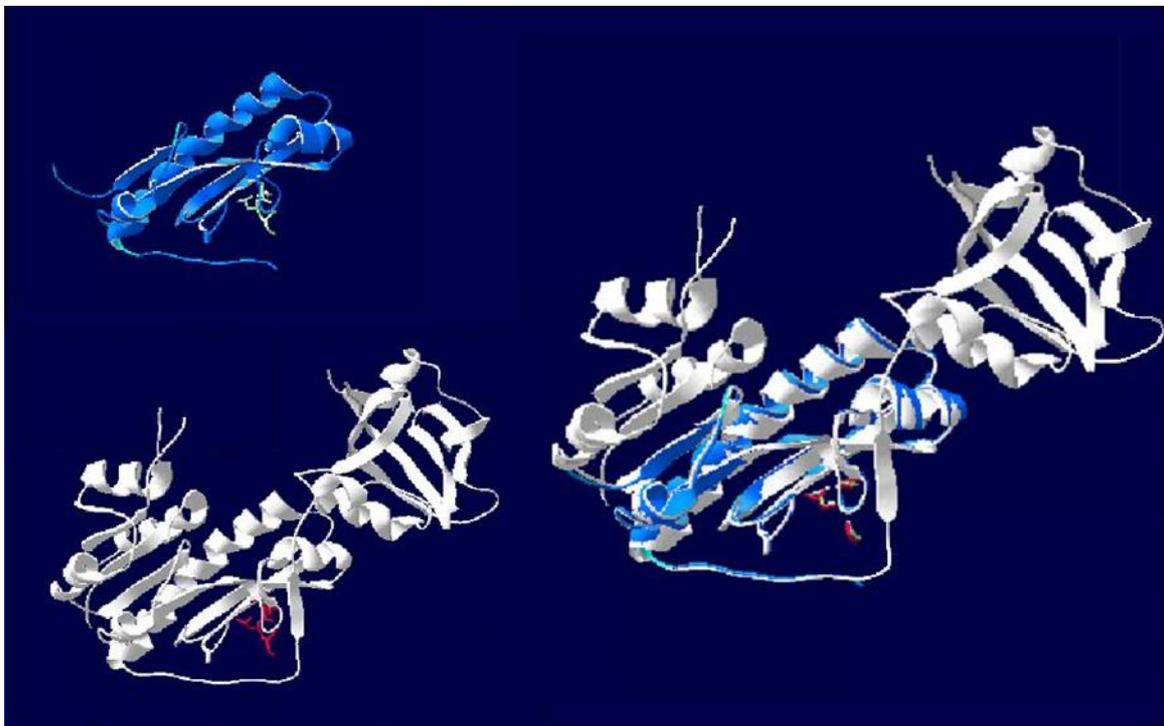
**Abbildung 5-12:**

Zusammenfassung der Ergebnisse der *in vitro*-Untersuchungen der ersten drei A-Domänen der Gramicidin-NRPS.

### 5.1.6 Die Formyltransferase – Domäne

Die ersten 200 Aminosäuren von LgrA hatten laut Sequenzvergleichen hohe Ähnlichkeit zum N-terminalen Bereich einiger Methionin-tRNA-Formyltransferasen des Primärmetabolismus von Prokaryoten, z.B. aus *Bacillus anthracis* (33% Identität, 52% Ähnlichkeit), *Fusobacterium nucleatum* (34% Identität, 58% Ähnlichkeit), oder *Clostridium tetanii* (35% Identität, 56% Ähnlichkeit). Bei Methionin-tRNA-Formyltransferasen (FMT) beherbergt der N-terminale Bereich die katalytische Funktion, wohingegen der C-terminale Bereich nur die strukturelle Funktion innehat, die tRNA so zu positionieren, daß das mit Methionin beladene 3'-OH-Ende der tRNA in die katalytische Tasche hineinragt (58). Dies wurde bei einem Modelling-Versuch mit SwissModell anhand der kristallisierten FMT aus *E. coli* bestätigt (58, 59). Dabei wurde die Tertiärstruktur der F-Domäne im Modell erstellt, indem nach Sequenzvergleichen mit der FMT basierend auf deren Tertiärstruktur das Programm eine Strukturvorhersage machte (s. Abb. 5-13).

Interessanterweise war die Ähnlichkeit mit der einzigen bislang bekannten putativen F-Domäne einer NRPS aus *Anabaena* Stamm 90 sehr gering, nämlich nur 17,2% Identität (37). Wenn jedoch lediglich die Aminosäuren 70-170 aus den N-terminalen



**Abbildung 5-13:**

Oben links, Modell der 3D-Struktur der F-Domäne (Aminosäuren 33-151). Unten links, Struktur der *E. coli* FMT. Rechts, Überlagerung. Rot und grün, die Seitengruppen des SLLP-Motives.

Bereichen beider putativer F-Domänen verglichen werden, findet man 35% Identität und 50% Ähnlichkeit. Daraufhin wurde die Aminosäuresequenz der F-Domäne aus *Anabaena* Stamm 90 genauer untersucht. Es konnte festgestellt werden, daß die C-terminale Region (~270 bp) der postulierten F-Domäne in Wirklichkeit der C-Terminus einer stark degenerierten C-Domäne ist; die Domänenstruktur von ApdA lautet somit F'-C-A-T-C-A-T-E.

Bei Sequenzvergleichen der beiden F-Domänen mit den verschiedenen FMTs konnte das N<sup>10</sup>-formyl-tetrahydrofolat (formylTHF)-Bindemotiv „SLLP“ im Bereich des N-Terminus bei all diesen gefunden werden (s. Abb. 5-14). Daher wurde auch für die F-Domäne von LgrA formylTHF als C1-Träger postuliert. Dieser sollte als Formylgruppen-Donor für die Formylierung der ersten Aminosäure Valin dienen.

Aus dem Sequenzalignment heraus wurde das Motiv IN(VL)HxSLLPxxRG für F-Domänen sowie Formyltransferasen, die formylTHF als Donor verwenden, postuliert.

```

GQILPK EILDAPKYGC INVHGSLLPRLRG GAPINWALWNGETK  Konsensussequenz
-----
87 GYILDKEIVSRFRGRI INLHP SLLPWNKGRDPVFWVSWD-ETP  Bacillus brevis ATCC 8185
79 RYVLPQEILELPRQFA INYHDAPLPRYAGVNATSWALMNQEK  Anabaena Stamm 90
92 GLILPKAVLDM PRLGC INVHGSLLPRWGA APIQRSLWAGDAE  Salmonella typhimurium LT2
90 MRLIGPTLLEAYGGRI INIHP SLLPSFPGKDAVGOALEAGVKV  Bacillus anthracis
89 GQIVPNEILEAPKYGC INVHASLLPELRGGAPIHYAIMEGKEK  Bacillus cereus
89 GQILPKELLDSPKYGC INVHASLLPELRGGAPIHYSILQGKKK  Bacillus subtilis
85 RHLIYDEILQLAPAGAF NLHGSLLPKYRGRAPLNWVVLVNGETE  Escherichia coli

```

#### Abbildung 5-14:

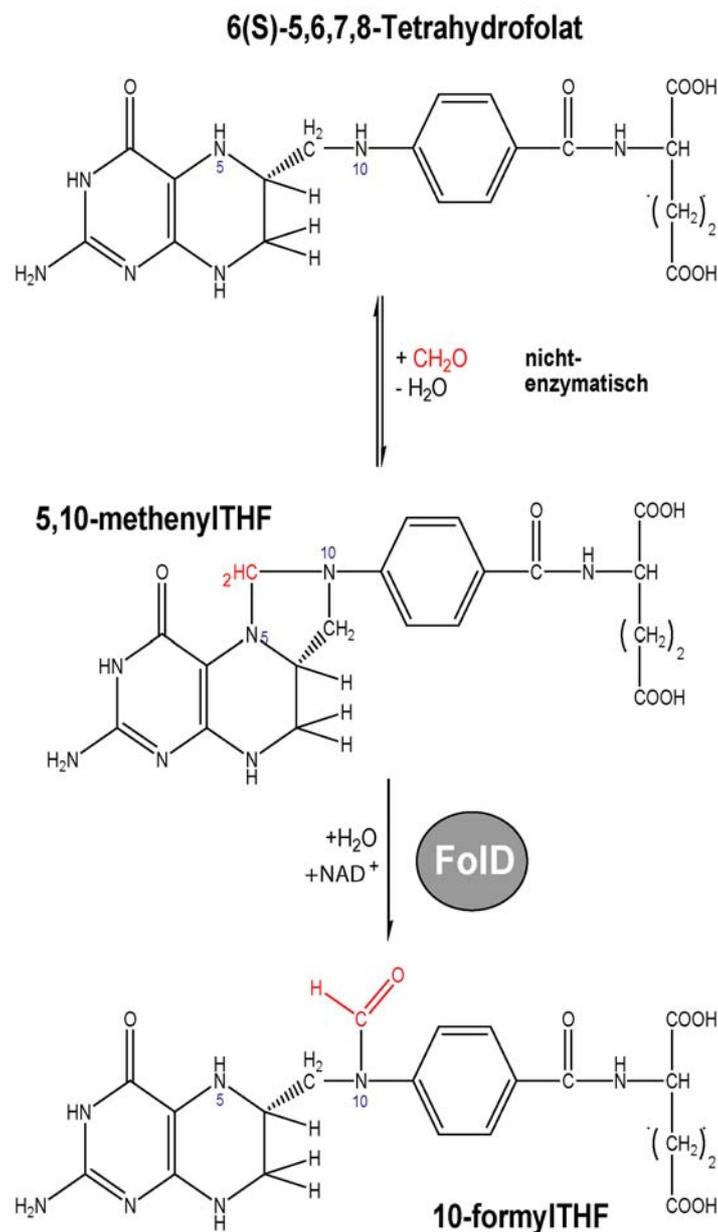
Ausschnitt aus dem Alignment der beiden putativen F-Domänen (obere 2 Sequenzen) und verschiedener FMTs (untere 6 Sequenzen). Die AS-Reste des postulierten Motivs sind rot markiert.

### 5.1.6.1 Versuche zur biochemischen Charakterisierung der F-Domäne

Der Kofaktor N<sup>10</sup>-formyl-Tetrahydrofolat ist im Gegensatz zum Kofaktor N<sup>5</sup>-formyl-Tetrahydrofolat nur 48 Stunden bei -20°C stabil und daher nicht kommerziell erhältlich. Es gibt zwei Möglichkeiten, den Kofaktor für biochemische Untersuchungen zu erhalten: chemische oder enzymatische Synthese. Dabei ist die enzymatische Synthese der chemischen vorzuziehen mit Hinblick auf Zeit- und Arbeitsaufwand sowie der Möglichkeit der radioaktiven Markierung der Formylgruppe. Für die enzymatische Synthese stellte Dr. Bärbel Buchenau der AG Prof. Dr. R. Thauer, MPI Marburg, das Plasmid pET-*foID* sowie eine Versuchsvorschrift zur Synthese von formylTHF zur Verfügung. *foID* kodiert für das Enzym FoID aus *Methanosarcina*

*barkeri*, welches aus 5,10-methenyl-Tetrahydrofolat unter  $\text{NAD}^+$ -Verbrauch formylTHF synthetisiert (s. 4-16 und Abb. 5-15; (60)). Die Reaktion kann quantitativ bei 340 nm im Photometer verfolgt werden.

Das Enzym FoID (31,9 kDa) konnte dank des rekombinanten His<sub>6</sub>-TAGs nach Überproduktion in *E. coli* BL21 und anschließender  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Affinitätschromatographie in hoher Reinheit und sehr guter Ausbeute (50 mg reines Protein / L *E. coli* Kultur) erhalten werden (s. Abb. 5-16). Der photometrische Assay zeigte die rasche Umsetzung der Edukte zu formylTHF.

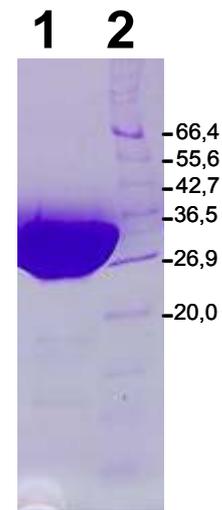


**Abbildung 5-15:**

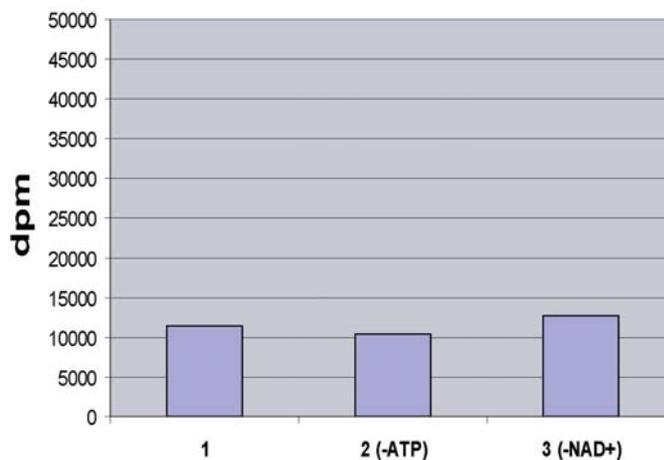
Synthese von 10-formylTHF. Aus THF und Formaldehyd entsteht 5,10-methenylTHF, daß als Substrat für FoID dient und unter  $\text{NAD}^+$ -Verbrauch zu 10-formylTHF hydrolysiert wird.

Als biochemischer Assay wurde folgender Ansatz gewählt: Es sollte zunächst eine Beladungsreaktion des Enzyms FAT (LgrA1) und separat davon eine formylTHF-Synthesereaktion angesetzt werden. Die Synthese des formylTHFs sollte allerdings mit  $^{14}\text{C}$ -markiertem  $\text{CH}_2\text{O}$  durchgeführt werden, wodurch die  $\text{N}^{10}$ -Formylgruppe während und nach dem Assay verfolgt werden kann. Anschließend sollen beide Reaktionsansätze gemischt und weitere 15 Minuten bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert werden. Als Negativkontrolle wurde ATP (essentiell für die Aktivierung der AS) oder  $\text{NAD}^+$  (essentiell für die formylTHF-Synthese) in der jeweiligen Reaktion weggelassen.

Leider konnte bei diesen Assays kein Unterschied der Reaktion zu den beiden Negativkontrollen beobachtet werden (s. Abb. 5-17). Mögliche Ursachen dafür sind in Kapitel 6.3 diskutiert.



**Abbildung 5-16:**  
Reinigung von FolD.  
1, Gereinigtes Protein.  
2, Marker [kDa].



**Abbildung 5-17:**

1, Formyltransferaseassay. 2, Assay ohne ATP. 3, Assay ohne  $\text{NAD}^+$ .

E1	E2	E3	E4	Konsensussequenz
PIQTWFF	HHLVVDGVSWR	DVLLAALA	EGHGRE	
16-PIQRDFF-22...140-HQLVVDEASWR-150...255-ELLLAALG-262...279-EKDGRE-284				LgrA2E
20-PIQTWFF-27...145-HHLVVDGVSWR-155...257-DVLLSALT-264...281-EGHGRE-286				LgrB2E
17-PIQTWFF-21...144-HHLAVDGVSWR-154...259-DILLTALA-266...283-EGHGRE-288				LgrB4E
32-PIQKFFF-38...161-HHLVVDGVSWR-171...277-DVLLAALA-284...301-EGHGRE-306				LgrC2E
22-PIQTWFF-28...150-HHLVVDGVSWR-160...266-DVLLAALT-271...290-EGHGRE-295				LgrC4E
17-PIQHWFF-21...143-HHLAVDGVSWR-153...258-DVLLTALA-265...282-EGHGRE-287				LgrC6E
17-PIQKFFF-21...144-HHLVVDGVSWR-154...260-DVLLAALA-267...284-EGHGRE-289				LgrD2E
E5	E6	E7	Konsensussequenz	
RTVGWFTSMYP	PHKGIGYG	FNYLGQ		
294-RTVGWFHSLFP-304...330-PHQSGYS-337...361-VHAWEQ-366			LgrA2E	
296-RTVGWFTSLYP-306...332-PDKGIGYG-339...364-FNYLGQ-369			LgrB2E	
298-RTVGWFTSMYP-308...334-PHKGLGYG-341...366-FNYLGQ-371			LgrB4E	
316-RTVGWFTSMYP-326...352-PQKIGYG-359...384-FNYLGQ-389			LgrC2E	
305-RTVGWFTSLYP-315...341-PNKGVGYG-348...373-FNYLGQ-378			LgrC4E	
297-RTVGWFTSMYT-307...333-PHKIGYG-340...363-FNYLGQ-368			LgrC6E	

**Abbildung 5-18:**

Alignment der 7 konservierten Bereiche aller Lgr-E-Domänen. Die E-Domäne von LgrA2 ist deutlich weniger konserviert als die anderen.

## 5.2 Die E-Domäne von LgrA2

Laut Modell waren 6 E-Domänen postuliert, da 6 D-Aminosäuren in Gramicidin vorkommen. Überraschenderweise wurde am C-Terminus von LgrA eine 7. E-Domäne gefunden. Das zugehörige Modul, LgrA2, aktiviert laut Modell und biochemischer Analyse jedoch ausschließlich Glycin, eine achirale Aminosäure (siehe 5.1.2). Bei genauerer Betrachtung der konservierten Bereiche dieser E-Domäne fiel auf, daß die meisten der 7 konservierten Bereiche schlecht bis gar nicht konserviert waren (siehe Abb. 5-18). Auch fehlte der katalytisch essentielle Histidinrest in Core E2, so daß diese E-Domäne inaktiv zu sein schien. Da die A-Domäne des Moduls LgrA2 keinerlei Nebenspezifitäten *in vitro* aufwies, konnte keine biochemische Bestätigung für diese These erhalten werden.

## 5.3 Die Reduktase – Domäne

Bei der Sequenzanalyse von LgrD wurde am C-Terminus eine Region von etwa 430 AS gefunden, die laut blast-Analyse eine putative Reduktase – Domäne ist. Diese R-Domäne zeigte Ähnlichkeit zu MxcG aus *Stigmatella aurantiaca* Sg a 15 (32% Identität, 48% Ähnlichkeit; (20)), SafA aus *Myxococcus xanthus* (36% Identität, 51% Ähnlichkeit; (24)), NcpB aus *Nostoc sp.* ATCC 53789 (41% Identität, 58% Ähnlichkeit; (25)) sowie Lys2 aus *Saccharomyces cerevisiae* (32% Identität, 50% Ähnlichkeit; (23)).

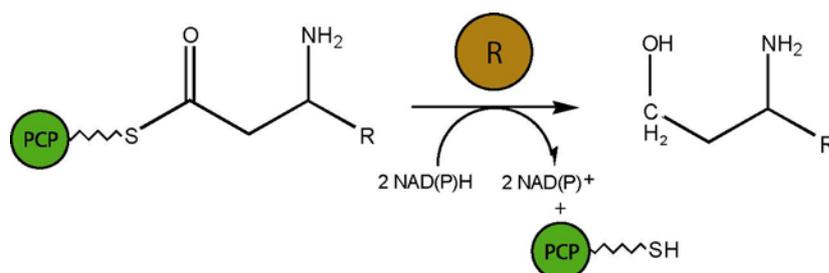
Im Folgenden sind die Reaktionsmechanismen kurz erläutert und in Abb. 5-20 ausführlich dargestellt.

Die Reduktasedomäne MxcG des Myxochelinoperons aus *Stigmatella aurantiaca* SG a15 katalysiert unter NAD(P)H-Verbrauch die Reduktion des Peptides zum Aldehyd-Intermediat und weiter zum Alkohol Myxochelin A (20). Es werden auch Aldehyd-Intermediate freigesetzt, die dann von MxcL transaminiert werden zum Produkt Myxochelin B (21, 22).

Lys2 katalysiert die Reduktion von als Thioester aktiviertem  $\alpha$ -Aminoacidat unter NADPH-Verbrauch am C<sub>6</sub> zum  $\alpha$ -Aminoacidat-Semialdehyd, das nach der Freisetzung schnell intramolekular zu  $\Delta^1$ -Piperidin-Carboxylat zyklisiert. Die offenkettige Form,  $\alpha$ -Aminoacidat-Semialdehyd, wird enzymatisch weiter in Lysin konvertiert wird (23).

Die dritte bekannte, jedoch nicht biochemisch charakterisierte, R-Domäne aus der Saframycinsynthetase SafA aus *Myxococcus xanthus* reduziert das Substrat wahrscheinlich zum Ala<sub>1</sub>-Gly<sub>2</sub>-LTyr<sub>3</sub>-LTyr<sub>4</sub>-CHO-Intermediat, welches dann intramolekular Schiff'sche Basen formt und zu einem stabilen Sechsring-Hemiaminal zyklisiert (24).

Die vierte R-Domäne aus der Nostocyclopeptid-Synthetase NcpB aus *Nostoc sp.* ATCC 53789 wurde ebenfalls bislang nicht biochemisch charakterisiert (25). Es scheint jedoch klar zu sein, daß das an das letzte PCP von NcpB gebundene Peptid Tyr<sub>1</sub>-Gly<sub>2</sub>-DGLn<sub>3</sub>-Ile<sub>4</sub>-Ser<sub>5</sub>-metPro<sub>6</sub>-Leu<sub>7</sub>/Phe<sub>7</sub>-S-R durch eine ein-Schritt-Reduktion freigesetzt wird, und daß anschließend die Aminogruppe der N-terminalen Aminosäure Tyrosin den Aldehyd angreift, so daß eine Imin-Zyklisierung stattfindet. Lys2, NcpB und SafA reduzieren ihre Substrate in einer ein-Schritt-Reaktion zum Aldehyd-Intermediat, und MxcG reduziert sein Substrat in einer zwei-Schritt-Reaktion zum Alkohol Myxochelin A. Die chemische Struktur von Gramicidin ließ eine zwei-Schritt-Reaktion der R-Domäne ähnlich MxcG vermuten (s. Abb. 5-19). Kofaktor bei diesen Reduktasen ist NADPH oder NADH.



**Abbildung 5-19:**

Modell zur zwei-Schritt-Reduktionsreaktion der R-Domäne.

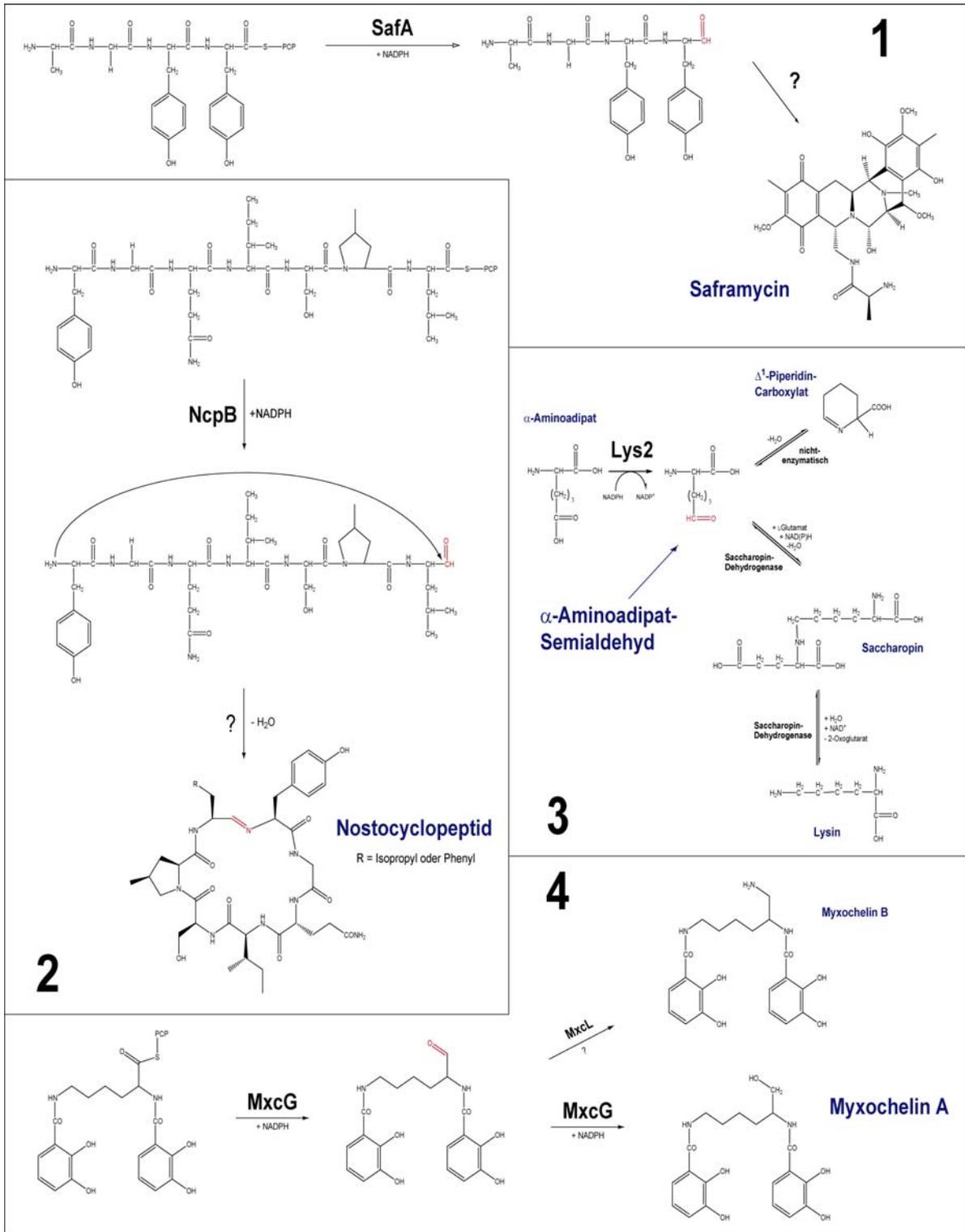
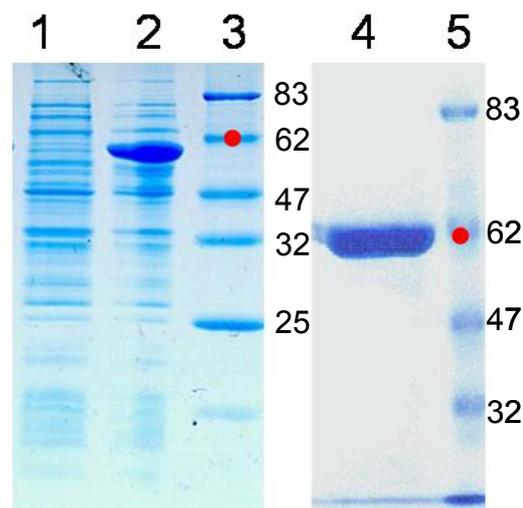


Abbildung 5-20:

Synthesemechanismus von 1, Saframycin; 2, Nostocyclopeptid; 3, alpha-Aminoadipat-Semialdehyd; 4, Myxochelin. Die Aldehydfunktion ist jeweils rot hervorgehoben.

#### 5.4 Biochemische Charakterisierung der Reduktase-Domäne

Um die katalytische Aktivität der Reduktase untersuchen zu können, mußte ein geeigneter Assay entwickelt werden. Eine *in vitro* – Rekonstitution des gesamten Biosyntheseweges mußte aufgrund der enormen Größe der vier Synthetasen ausgeschlossen werden. Daher wurde zunächst versucht, eine Aktivität der Reduktase mittels eines Substratanalogons nachzuweisen. Dazu wurden die letzten 4 Aminosäuren des linearen Gramicidin zusammen mit einem C-terminalen Glycin gemäß des aufgestellten Biosynthesemodells als Pentapeptid synthetisiert und an N-Acetylcysteamin (SNAC) gekuppelt. Dieser SNAC ist ein Analogon des terminalen Teils des 4'-Ppant-Kofaktors des PCPs und es konnte gezeigt werden, daß einige TE-Domänen Peptidyl-SNACs als Substrate akzeptieren und umsetzen können (61). Das synthetisierte Substrat, Ac-DLeu-Trp-DLeu-Trp-Gly-SNAC, sollte im Erfolgsfalle mit zwei Molekülen NADPH zum entsprechenden Alkohol reduziert werden, so daß der C-Terminus des Peptids wie bei Gramicidin A aus Ethanolamin bestehen würde. Zunächst wurde der für die Reduktase kodierende Bereich in den Vektor pBAD202 kloniert, in *E. coli* BL21 eingebracht und überproduziert. Das Protein „R“ (62,1 kDa) konnte anschließend mittels Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt und nach Ankonzentration und Dialyse im Reduktaseassay eingesetzt werden (s. Abb. 5-21). Das Substrat Ac-DLeu-Trp-DLeu-Trp-Gly-SNAC wurde im Versuch allerdings nicht vom Enzym als Substrat akzeptiert. Es konnte kein Unterschied des HPLC-UV-Chromatogramms im Vergleich zur Negativkontrolle ohne NADPH festgestellt werden, auch wurde keine Änderung bei den zugehörigen *total ion*-Chromatogrammen beobachtet.



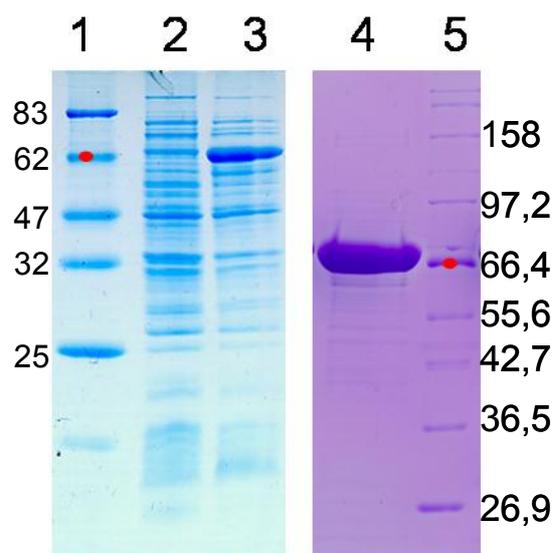
**Abbildung 5-21:**

SDS-PAGEs. Überproduktion von R in *E. coli* BL21 und Reinigung. 1, vor Induktion. 2, nach Induktion. 3, Marker. 4, R nach Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitätschromatographie. 5, Marker.

### 5.5 Untersuchungen der R-Domäne mit einem Peptidyl-CoA-Substrat

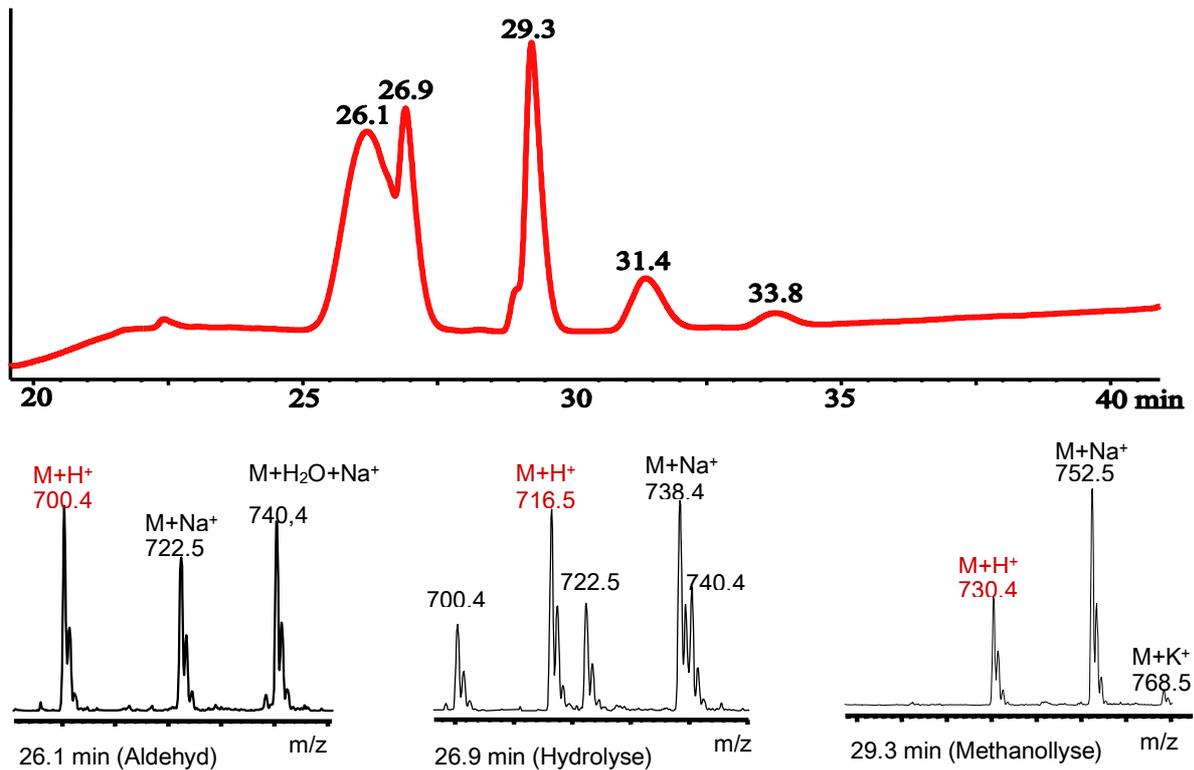
Es wurde ein weiterer Versuch unternommen, bei dem das Pentapeptid an Koenzym A (CoA) gekuppelt wurde. Die Analyse der Röntgenkristallstruktur einer 4'-Ppant-Transferase, Sfp aus *Bacillus subtilis*, hat gezeigt, daß das CoA von diesem Enzym gebunden wird, so daß die Thiolgruppe weit aus der Bindetasche des Enzyms herausragt (s. 2.1.2; (10)). Dadurch ist es möglich, *in vitro* PCPs künstlich mit Peptidketten zu beladen, indem man Peptidyl-CoAs synthetisiert und mit diesen die *apo* – *holo* – Konvertierung des PCPs unter Katalyse von Sfp durchführt. So erhält man ein „vorbeladenes“ PCP, das nun wiederum einem benachbarten Enzym das gebundene Substrat präsentieren kann. Diese noch relativ neue Methode konnte erfolgreich bei Thioesterasen eingesetzt werden, die zuvor keine Peptidyl-SNAC Substrate akzeptiert hatten (11).

Dazu wurde der für die letzten beiden Domänen, PCP und R, kodierende Bereich in pBAD202 kloniert, in *E. coli* BL21 eingebracht und als *apo*-Protein überproduziert. Auch dieses Protein „TR“ (70,1 kDa) konnte erfolgreich mittels Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt und nach Konzentration und Dialyse im Reduktaseassay eingesetzt werden (s. Abb. 5-22). Als Substratmimic wurde Ac-DLeu<sub>12</sub>-LTrp<sub>13</sub>-DLeu<sub>14</sub>-LTrp<sub>15</sub>-Gly<sub>16</sub>-S-CoA verwendet, so daß die letzten fünf Aminosäuren des Gramicidin-Precursors an CoA gekuppelt waren.



**Abbildung 5-22:**

SDS-PAGEs. Überproduktion von PCP-R in *E. coli* BL21 und Reinigung.  
 1, Marker. 2, vor Induktion. 3, nach Induktion. 4, PCP-R nach Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitätschromatographie. 5, Marker.



**Abbildung 5-23:**

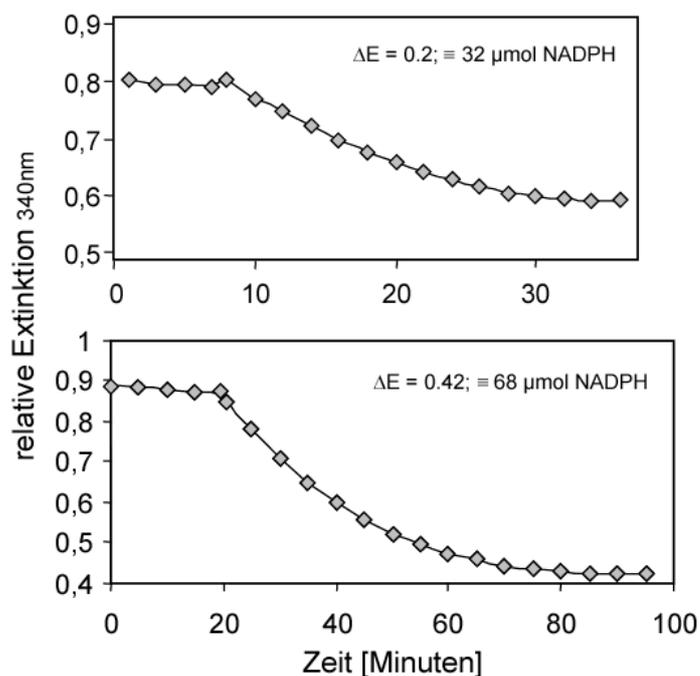
Oben, *total ion*-chromatogramm des Assays bei pH 6. Unten, Massenspektrogramme der Peaks bei 26.1, 26.9 und 29.3 Minuten. Den Peaks bei 31.4 und 33.8 min konnte keine Masse aus dem gemessenen Bereich 650 – 850 amu zugeordnet werden.

Der Assay wurde bei vier verschiedenen pH-Werten durchgeführt zur Bestimmung optimaler Bedingungen. Es wurden bei den Negativkontrollen entweder Enzym, Substrat, Sfp oder NADPH weggelassen. Unter allen pH-Bedingungen zeigte die Analyse des UV-Chromatogramms einen deutlichen Unterschied des Assays zu den vier Negativkontrollen, die wiederum untereinander alle gleich waren. Es wurden drei Peaks im UV- und *total ion*-chromatogramm beobachtet. Diese Peaks entsprachen dem Aldehyd (M+H<sup>+</sup> 700,4; errechnet M+H<sup>+</sup> 700,2), dem Hydrolyseprodukt (M+H<sup>+</sup> 716,4; errechnet M+H<sup>+</sup> 716,2) sowie dem Methanolyseprodukt (M+H<sup>+</sup> 730,4; errechnet M+H<sup>+</sup> 730,2); s. Abb. 5-23. Eine Fragmentierungsanalyse mittels Tandem-Massenspektrometrie (MS-MS) konnte den Aldehyd bestätigen. Dieses Ergebnis war sehr überraschend, da die Bildung des Alkohols (errechnet M+H<sup>+</sup> 702,2) erwartet worden war. Der Hydrolyse-Peak war gering bei pH 5 und 6 und stieg stark an bei pH 7. Bei pH 8 überstieg er den Aldehyd-Peak sogar (Vergleiche jeweils nach Integration der jeweiligen Peaks). Dies ist auf die Instabilität des Thioesters unter alkalischen Bedingungen zurückzuführen. Das Methanolyseprodukt, welches auch beobachtet wurde, entsteht erst nach Abstoppen des Assays. Dieser wird im Verhältnis 1:10 (v / v) mit 100 % Methanol zur Ausfällung aller Proteine abgestoppt, zentrifugiert und

der nun proteinfreie Überstand wird bei 30 °C in der SpeedVac etwa 4 Stunden bis zur Trockne eingengt. Bei der Erwärmung kann Methanol das überschüssige Peptidyl-CoA am Thioester angreifen, was zur Bildung von CoA und dem Peptidyl-Methylester führt. Nach diesen Untersuchungen wurde der Assay standardmäßig bei pH 6 durchgeführt. Auch wurde teilweise die Addition von Wasser an den Aldehyd beobachtet (Massensignal +18 amu), was bei Peptid-Aldehyden häufig beobachtet wird (62).

### 5.5.1 Quantifizierung durch photometrische Assays

Im Anschluß an diesen Versuch wurde ein photometrischer Assay durchgeführt, da der Verbrauch von NADPH durch abnehmende Extinktion bei einer Wellenlänge von 340 nm quantitativ verfolgt werden kann. Dadurch kann der Assay trotz der *single turnover* Reaktion auch zeitaufgelöst verfolgt werden. Zunächst wurde eine Kalibrierungsgerade mit NADPH-Konzentrationen von 0 bis 100 µmol erstellt. Anschließend wurde der Reduktase-Assay bei pH 6 wie oben beschrieben durchgeführt mit der Änderung, daß das Volumen nicht auf 100 µL, sondern auf 200 µL angepaßt wurde. Der Assay wurde einmal ohne Sfp und Substrat und einmal komplett durchgeführt (s. Abb. 5-24). Die Negativkontrolle zeigte, daß 1,07 Moleküle NADPH je Molekül Enzym verbraucht wurde (32 µmol NADPH auf 30 µmol Enzym).



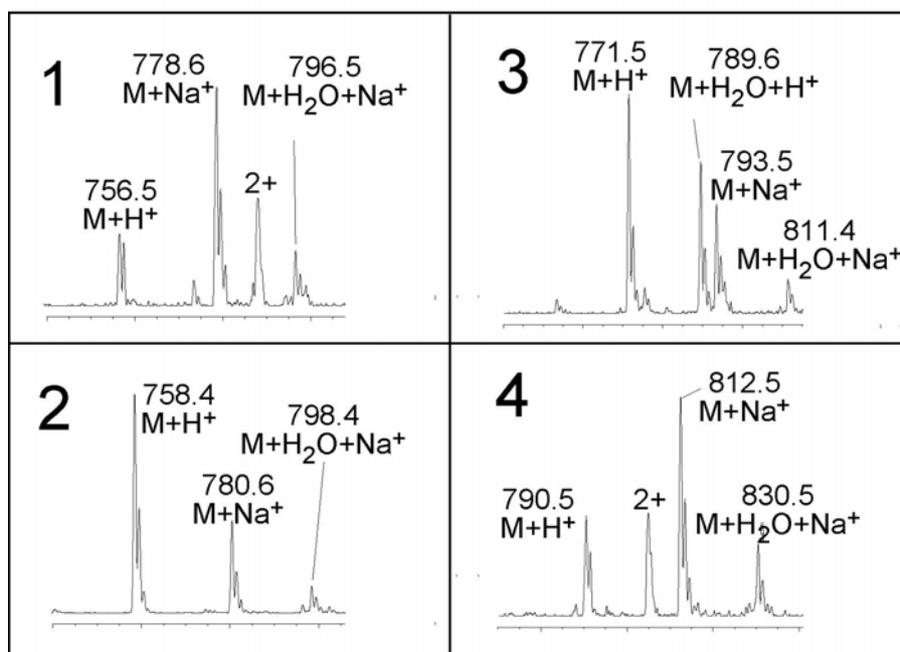
**Abbildung 5-24:**

Photometrischer Assay. Oben, Negativkontrolle ohne Substrat und Sfp. Unten, Reduktaseassay.

Dies weist auf eine Sättigung des Enzyms mit Kofaktor hin. Im Assay mit Substrat und Sfp wurden 2,2 Moleküle NADPH je Molekül Enzym verbraucht (68  $\mu\text{mol}$  NADPH auf 30  $\mu\text{mol}$  Enzym). Dies zeigte die Umsetzung des Substrates in der *single turnover* Reaktion sowie die anschließende erneute Sättigung des Enzyms mit Kofaktor.

### 5.5.2 Einfluß der C-terminalen Aminosäure auf die Reduktions-Reaktion

Im Anschluß an diese Untersuchungen wurden vier weitere Substrate synthetisiert, bei denen Gly<sub>16</sub> gegen repräsentative Vertreter aus den Gruppen der aliphatischen, geladenen und aromatischen Aminosäuren ausgetauscht wurde. Es wurden LLeu, LAsp, LLys und LPhe ausgewählt. Mit diesen vier Derivaten wurden dann die Reduktase-Assays durchgeführt und mittels HPLC-MS analysiert. Es zeigte sich, daß die R-Domäne in allen vier Fällen das Derivat akzeptierte und in einer ein-Schritt-Reaktion zum entsprechenden Aldehyd reduzierte (s. Abb. 5-25). Auch hier konnte jeweils die teilweise Addition von Wasser an den Aldehyd beobachtet werden.



**Abbildung 5-25:**

Massenspektrogramme der Reduktaseassays des jeweiligen Aldehyd-Peaks.  
Substrate: AcDLeu-LTrp-DLeu-LTrp-X-S-CoA. 1: X = LLeu, 2: X = LAsp, 3: X = LLys, 4: X = LPhe.

### 5.5.3 Einfluß der Stereochemie auf die Substratakzeptanz der R-Domäne

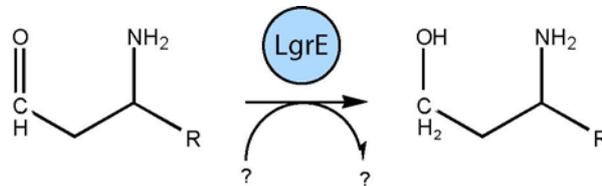
Zuletzt wurde noch der Einfluß der D/L-Konfiguration der Nachbar-Aminosäuren des Glycin<sub>16</sub> auf die Aktivität der R-Domäne untersucht. Dazu wurden zwei weitere Substrate synthetisiert, Ac-DLeu<sub>12</sub>-DTrp<sub>13</sub>-DLeu<sub>14</sub>-DTrp<sub>15</sub>-Gly<sub>16</sub>-S-CoA und Ac-LLeu<sub>12</sub>-LTrp<sub>13</sub>-LLeu<sub>14</sub>-LTrp<sub>15</sub>-Gly<sub>16</sub>-S-CoA. Auch diese beiden Substrate wurden unter den Standard-Assaybedingungen von der R-Domäne zum Aldehyd umgesetzt.

### 5.5.4 Kristallisationsversuche mit der R-Domäne

Um den Reaktionsmechanismus der R-Domäne klären zu können, wurde versucht, die R-Domäne zu kristallisieren, um anschließend mittels Röntgenstrukturanalyse die Struktur des Proteins zu erhalten. Dazu sollte die R-Domäne rekombinant mit einem C-terminalen His<sub>6</sub>-TAG in *E. coli* überproduziert und dann gereinigt und ankonzentriert werden. Da das rekombinante Protein aus pBAD202 außer dem His<sub>6</sub>-TAG noch N-terminal mit Thioredoxin fusioniert ist, sollte das Gen neu kloniert werden. Dazu wurde aus dem Vektor pBAD202-*tr* das Insert TR samt Gen für Thioredoxin mit NcoI und HindIII herausgeschnitten, und das Gen für die R-Domäne wurde mit den entsprechenden Schnittstellen mittels PCR amplifiziert, mit Restriktionsenzymen geschnitten und in pBAD202 ligiert (Resultat: pNKH1-R). Nach Einbringung des Vektors pNKH1-R in *E. coli* Top10 konnte die Überproduktion des erwarteten Genprodukts gezeigt werden. Anschließend wurde die R-Domäne mittels His<sub>6</sub>-TAG Affinitätschromatographie aufgereinigt, auf 8,6 mg/mL ankonzentriert und sterilfiltriert. Es wurden der *Sigma Basic Screen* und der *Sigma Expanded Screen* benutzt, um 100 verschiedene Bedingungen zur Kristallisation bei 18 °C zu erhalten. Leider konnte selbst nach 6 Monaten keinerlei Kristallbildung bei den Proben beobachtet werden.

## 5.6 Die Aldoreduktase LgrE

Die Ergebnisse aus Teil 5.2 wiesen darauf hin, daß es ein weiteres Enzym geben müßte, das die Reduktion des Aldehydintermediats zum Alkohol katalysiert (s. Abb. 5-25). Bei genauerer Betrachtung der *lgr*-Region aus Tabelle 5-1 fiel auf, daß etwa 2 kb vor *lgrA* ein ORF liegt, der laut Sequenzanalyse für eine putative Oxidoreduktase der Familie Aldo- / Ketoreduktasen kodiert. Da es zwei putative Startcodons im Leseraster gab (s. Abb. 5-26), die 142 bp auseinanderlagen, wurden beide möglichen ORFs in pBAD202 kloniert, in *E. coli* Top10 eingebracht und überproduziert.



**Abbildung 5-26:**

Postulierter Reaktionsmechanismus für LgrE.

Sowohl bei *E. coli* Top10 pBAD-*lgrE\_long* als auch bei *E. coli* Top10 pBAD-*lgrE\_short* konnte nach Induktion mit Arabinose bei einer Analyse der Vollzellextrakte eine deutlich überproduzierte Proteinbande im Bereich des erwarteten Molekulargewichts beobachtet werden. Es wurde versucht, aus beiden Stämmen das jeweilige Protein mittels Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitätschromatographie zu reinigen. Dies gelang nur für das Protein LgrE\_short, wohingegen sich das Protein LgrE\_long nach Zellaufschluß in der unlöslichen Zellfraktion befand. Demnach schien der kürzere ORF der richtige zu sein und wurde *lgrE* genannt, das zugehörige Genprodukt LgrE (76,1 kDa). Nach Reinigung, Dialyse und Ankonzentration wurde der Reduktaseassay wiederholt, hierbei einmal mit und einmal ohne die Zugabe von LgrE (s. Abb. 5-27). Die Auswertung zeigte eine deutliche Veränderung des HPLC-

```

7928 cgt ggc gca cat gga agc atg gag aaa gca cac cag tgc ttc gtt cca gat gca cat gct gca agg cga cca ttt ctt tct cca ttc gga aca gga aca act
    r g a h g s m e k a h q c f v p d a h a a r r p f l s p f g t g t t
8030 ttt ggc gat cat cga atc aac att aca aag cta tct ggt tgg gta dag ggg gat cgg atg att aca gga aaa gcg aca ctg gaa ggg aca cag cga ctg l a
    f g d h r i n i t k l s g w v q g d r m i t g k a t l e g t q r l a
  
```

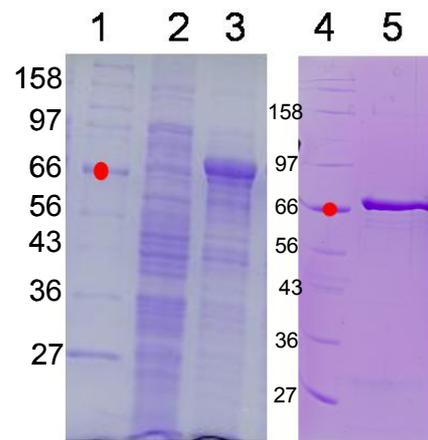
**Abbildung 5-27**

Ausschnitt der DNA-Region am 5'-Ende des ORFs *lgrE*. Die beiden putativen Startcodons sind rot markiert, die putative RBS grün.

UV-Chromatogramms.

Das Peak mit der Masse 700,4 (Aldehyd errechnet:  $M+H^+$  700,2) verschwand in Anwesenheit von LgrE komplett, und statt dessen erschien ein neuer Peak mit der Masse 702,4 (Alkohol errechnet:  $M+H^+$  702,2). Diese Assays wurden wiederholt mit dem Unterschied, daß alternativ NADH und NADPH als Kofaktoren angeboten wurden. Hier wurde beobachtet, daß der Assay mit NADH unverändert war nach Zugabe von LgrE, wohingegen im Assay mit NADPH nach Zugabe

von LgrE die komplette Umwandlung des vorhandenen Aldehyds in Alkohol gezeigt werden konnte (s. Abb. 5-29). Offenbar ist LgrE eine NADPH-abhängige Aldoreduktase, während die R-Domäne sowohl NADPH als auch NADH als Kofaktor verwenden kann. Es wurden auch noch die anderen Substrate in diesen gekoppelten Assays eingesetzt (s. Abb. 5-31). Hierbei zeigte sich, daß LgrE unter den Untersuchungsbedingungen bei Substrat Nr. 3 nur 5% des Aldehyds mit C-terminalem Aspartat zum Alkohol umsetzte (s. Abb. 5-30). Bei dem siebten Substrat (D-Aminosäuren) konnte auch nur etwa 50% Umsetzung beobachtet werden. Bei den anderen Substraten (1+2, 4-6) wurde der jeweils entstandene Aldehyd unter diesen Bedingungen zu 100% zum Alkohol umgesetzt (s. Tabelle 5-3).



**Abbildung 5-28:**

SDS-PAGEs. Überproduktion von LgrE in *E. coli* Top10 und Reinigung. 1+4, Marker. 2, vor Induktion. 3, nach Induktion. 5, LgrE nach Reinigung.

Nr.	Substrat (ans PCP gebunden)	Akzeptanz durch R-Domäne	*Aldehyd-Substrat	Umsetzung durch LgrE
1	Ac-DLeu <sub>12</sub> -LTrp <sub>13</sub> -DLeu <sub>14</sub> -LTrp <sub>15</sub> -Gly <sub>16</sub> -S-R	+	Ac-DLeu <sub>12</sub> -LTrp <sub>13</sub> -DLeu <sub>14</sub> -LTrp <sub>15</sub> -Gly <sub>16</sub> *	100%
2	Ac-DLeu <sub>12</sub> -LTrp <sub>13</sub> -DLeu <sub>14</sub> -LTrp <sub>15</sub> -LLeu <sub>16</sub> -S-R	+	Ac-DLeu <sub>12</sub> -LTrp <sub>13</sub> -DLeu <sub>14</sub> -LTrp <sub>15</sub> -LLeu <sub>16</sub> *	100%
3	Ac-DLeu <sub>12</sub> -LTrp <sub>13</sub> -DLeu <sub>14</sub> -LTrp <sub>15</sub> -LAsp <sub>16</sub> -S-R	+	Ac-DLeu <sub>12</sub> -LTrp <sub>13</sub> -DLeu <sub>14</sub> -LTrp <sub>15</sub> -LAsp <sub>16</sub> *	~ 5%
4	Ac-DLeu <sub>12</sub> -LTrp <sub>13</sub> -DLeu <sub>14</sub> -LTrp <sub>15</sub> -LLys <sub>16</sub> -S-R	+	Ac-DLeu <sub>12</sub> -LTrp <sub>13</sub> -DLeu <sub>14</sub> -LTrp <sub>15</sub> -LLys <sub>16</sub> *	100%
5	Ac-DLeu <sub>12</sub> -LTrp <sub>13</sub> -DLeu <sub>14</sub> -LTrp <sub>15</sub> -LPhe <sub>16</sub> -S-R	+	Ac-DLeu <sub>12</sub> -LTrp <sub>13</sub> -DLeu <sub>14</sub> -LTrp <sub>15</sub> -LPhe <sub>16</sub> *	100%
6	Ac-LLeu <sub>12</sub> -LTrp <sub>13</sub> -LLeu <sub>14</sub> -LTrp <sub>15</sub> -Gly <sub>16</sub> -S-R	+	Ac-LLeu <sub>12</sub> -LTrp <sub>13</sub> -LLeu <sub>14</sub> -LTrp <sub>15</sub> -Gly <sub>16</sub> *	100%
7	Ac-DLeu <sub>12</sub> -DTrp <sub>13</sub> -DLeu <sub>14</sub> -DTrp <sub>15</sub> -Gly <sub>16</sub> -S-R	+	Ac-DLeu <sub>12</sub> -DTrp <sub>13</sub> -DLeu <sub>14</sub> -DTrp <sub>15</sub> -Gly <sub>16</sub> *	~ 50%

**Tabelle 5-3:**

Ergebnisse der Reduktaseassays (Spalte 2) und gekoppelten Reduktaseassays (Spalte 3) mit den 7 verschiedenen Substratvarianten.

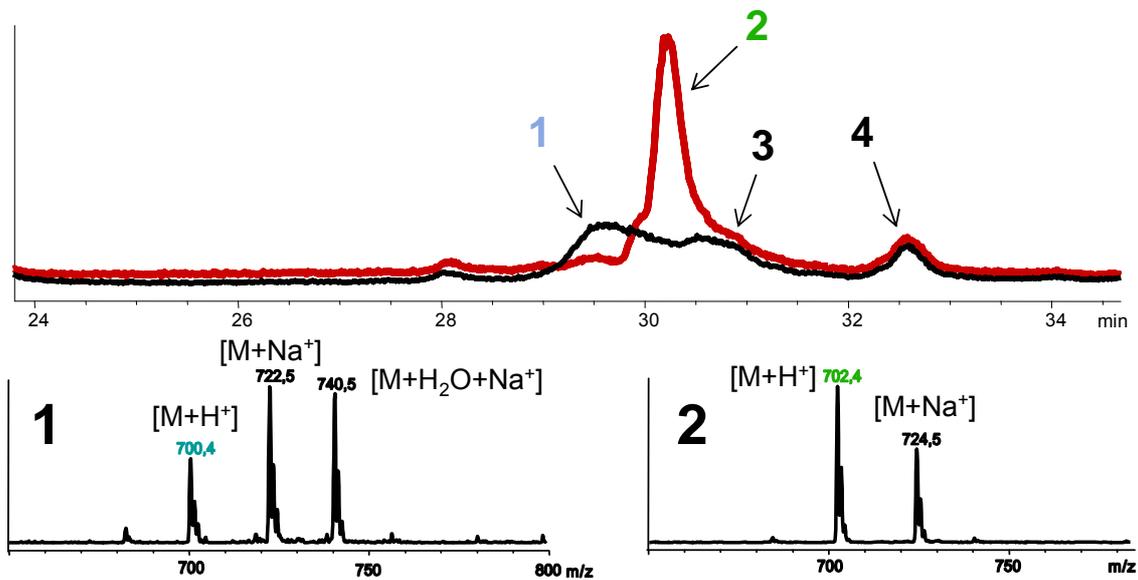


Abbildung 5-29:

Oben, *total ion*-chromatogramm des Reduktaseassays ohne LgrE (schwarz) und mit LgrE (rot). Peak 1: Aldehyd, Peak 2: Alkohol, Peak 3: Hydrolyse und Peak 4: Methanolyse. Unten, Massenspektrogramm von Peak 1 (Aldehyd) und Peak 2 (Alkohol). Der Aldehyd wurde von LgrE zu 100% in das Alkohol-Produkt umgesetzt.

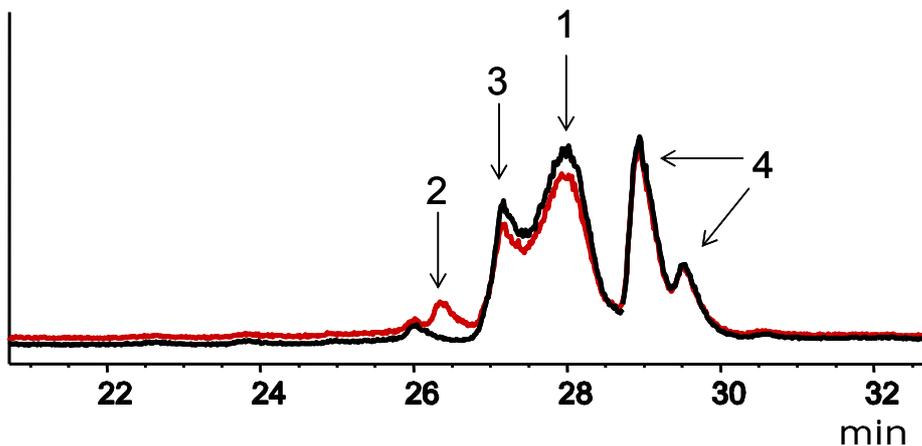


Abbildung 5-30:

*total ion*-Chromatogramm des Assays mit Asp<sub>16</sub>-Substrat. Schwarz, Assay ohne LgrE. Rot, Assay mit LgrE. Das Aldehyd-Substrat wird nur zu ~ 5 % zum Alkohol umgesetzt. 1, Aldehyd. 2, Alkohol. 3, Hydrolyse. 4, Methanolyse.

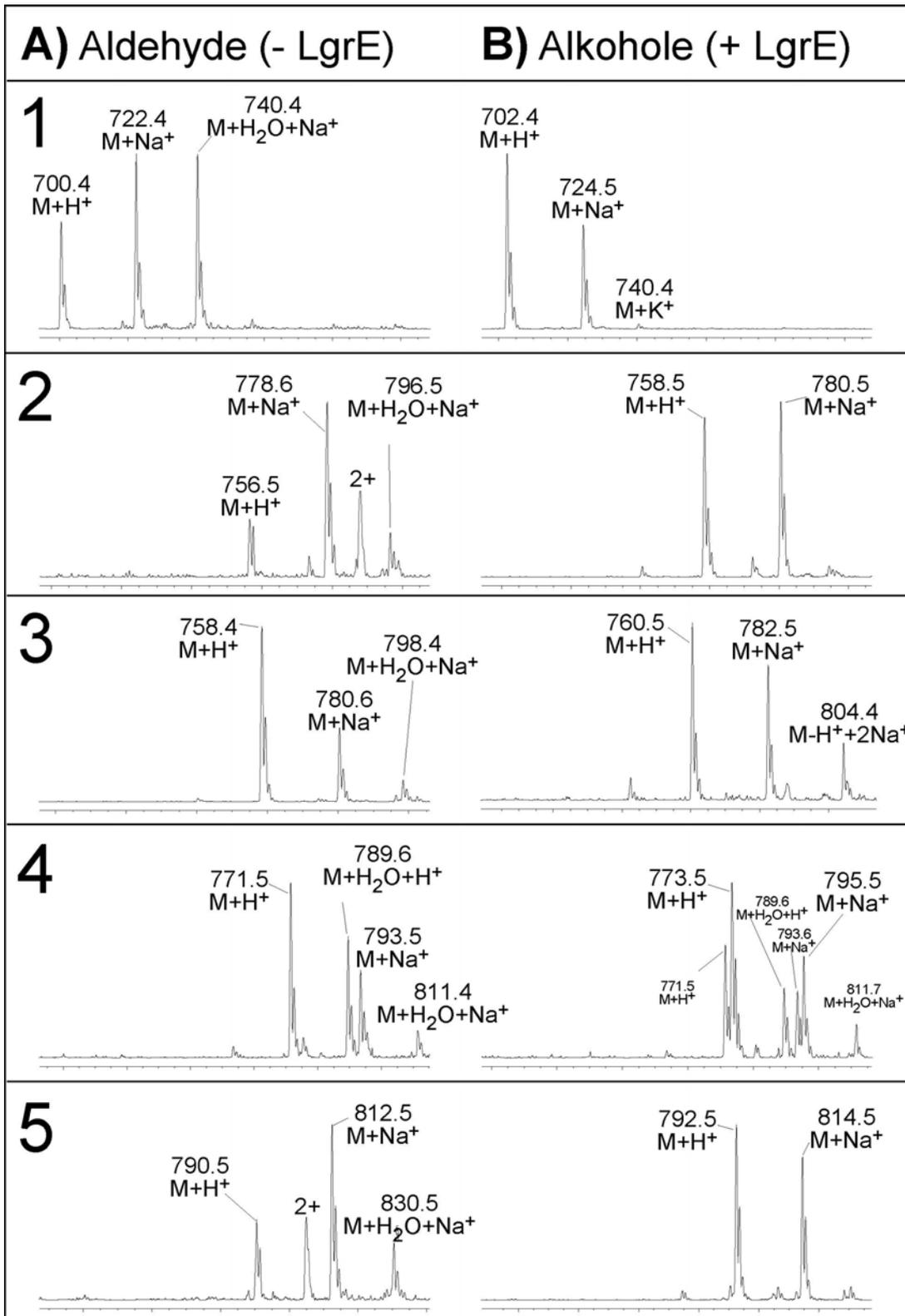


Abbildung 5-31:

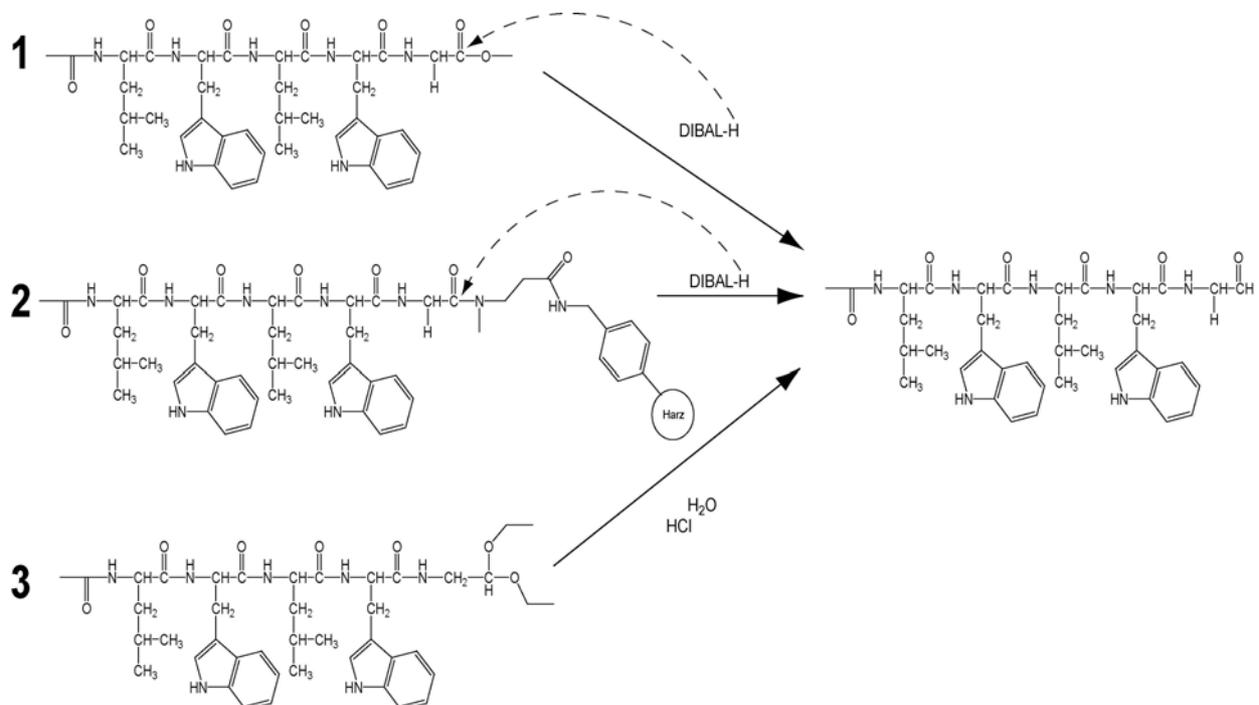
Vergleich der Massenspektrogramme der Aldehyde (-LgrE) und Alkohole (+LgrE). Substrate: AcDLeu-LTrp-DLeu-LTrp-X-S-CoA. 1: X = Gly, 2: X = LLeu, 3: X = LAsp, 4: X = Llys, 5: X = LPhe.

### 5.6.1 Chemische Synthese des Aldehyd-Substrats

Um die Aldoreduktase unabhängig von einem gekoppelten Assay untersuchen zu können, sollte der Aldehyd des natürlichen Substratmimics chemisch synthetisiert werden (s. Abb. 5-31). Die genauen Versuchsdurchführungen der drei Strategien sind in Kapitel 4-13 erläutert. Die ersten beiden Ansätze wurden in Kooperation mit Christian Renner der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. T. Schrader durchgeführt.

Die erste Strategie basierte auf einer zwei-Schritt-Synthese, wobei im ersten Schritt die Peptidsäure nach erfolgreicher Peptidsynthese säurekatalysiert mit MeOH zum Methylester umgesetzt werden sollte. Im zweiten Schritt sollte dieser Ester durch Zugabe des Reduktionsmittels DIBAL-H in Toluol zum Aldehyd umgesetzt werden. Beim Arbeiten mit DIBAL-H muß darauf geachtet werden, daß die Reaktion in einem absolut wasserfreiem Medium durchgeführt wird, da beim Kontakt von DIBAL-H mit H<sub>2</sub>O Wasserstoff entsteht, so daß pro Wassermolekül im Medium ein Molekül DIBAL-H inaktiviert wird.

Die Umsetzung der Peptidsäure zum Methylester gelang sehr gut und vollständig; es wurden keine Reste der Säure mehr gefunden, hingegen große Mengen des Produktes ( $M+H^+$  730, errechnet  $M+H^+$  730,2). Allerdings konnte nach Zugabe des DIBAL-H nicht das gewünschte Produkt erhalten werden. Stattdessen wurde ein



**Abbildung 5-31:**

Die drei Synthesestrategien zur Darstellung des Aldehyd-Substrates.

1, Reduktion des zum Methylester aktivierten C-Terminus. 2, Reduktion des als Weinreb-Amid aktivierten C-Terminus. 3, Herbeiführung der Rück-Acetalreaktion nach Kupplung von Aminoacetaldehyd-Diethylacetal an das Tetrapeptid.

neuer Peak im Spektrum beobachtet. Die Masse dieses Peaks entsprach wahrscheinlich dem des an der N-terminalen Acetylgruppe reduzierten Methylesters (beobachtet:  $M+H^+$  716, errechnet  $M+H^+$  716,2). Diese Masse entspricht theoretisch auch der des hydrolysierten Methylesters; dies ist jedoch sehr unwahrscheinlich, da in wasserfreiem Milieu unter reduzierenden Bedingungen gearbeitet wurde.

Da der zum Methylester aktivierte C-Terminus des Peptids offenbar nicht reaktiv genug für die Reduktion mit DIBAL-H war, wurde eine zweite Strategie versucht. Dieses Mal wurde die Peptidsynthese an einem speziellen Harz durchgeführt, wobei das Peptid am Ende der Synthese als sogenanntes Weinreb-Amid ans Harz gebunden vorliegt. Dieses Weinreb-Amid sollte deutlich reaktiver als ein Methylester sein. Dieses Mal konnte gar keine Änderung des Spektrums des Reaktionsgemisches beobachtet werden, was wahrscheinlich bedeutet, daß auch das Weinreb-Amid keine geeignete Abgangsgruppe für die Reduktionsreaktion ist, d.h. daß kein Produkt vom Harz „herunterreduziert“ werden konnte.

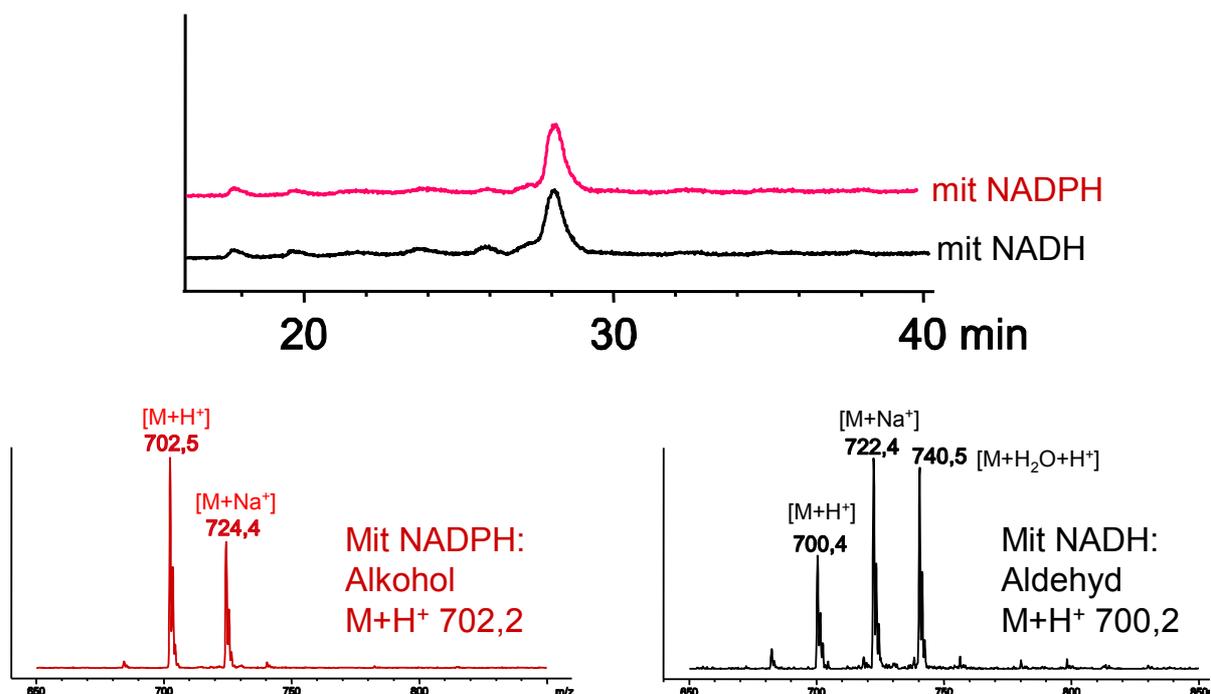
Die dritte Strategie zur Darstellung des Aldehyds war, daß zunächst das Peptid ohne das C-terminale Glycin synthetisiert wurde und anschließend Aminoacetaldehyd-Diethylacetal an dieses gekuppelt werden sollte. Danach sollte die Acetalrückreaktion zum gewünschten Aldehyd erzwungen werden. Das Reaktionsgemisch wurde durch präparative HPLC aufgetrennt. Die Untersuchung aller Fraktionen nach der Reaktion ergab aber keine Fraktion mit dem Aldehyd-Produkt. Eine Probe der Reaktion war parallel mittels analytischer HPLC untersucht worden. Es konnte kein Peak mit der Masse des Aldehyds gefunden werden, jedoch war ein deutliches Peak mit der Masse des Alkohols vorhanden. Somit war auch der dritte mögliche Weg zur Darstellung des Aldehyds gescheitert.

### 5.6.2 Enzymatische Synthese des Aldehyd-Substrats

Es wurde nun beschlossen, den Aldehyd auf die einzige bislang erfolgreiche Art zu erhalten: Isolation des Produktes nach Umsetzung des Peptidyl-CoA-Substrates mit der R-Domäne. Dazu wurde ein 75facher Ansatz des analytischen Assays durchgeführt, für den das gesamte Substrat einer kompletten Peptidyl-CoA-Synthese sowie das aufgereinigte Reduktaseprotein aus 12,5 L *E. coli* – Kultur eingesetzt wurde. Nach Reinigung des Assays mittels präparativer HPLC wurden die beiden Fraktionen, die laut MALDI-TOF Analyse den Aldehyd enthielten, vereinigt und lyophilisiert. Insgesamt wurden ~95 µg Aldehyd erhalten, wobei dieser Wert bereits deutlich unterhalb der Meßgrenze der Feinwaage lag und deshalb ungenau sein

könnte. Die erhaltene Menge Substrat reichte für genau 13 Proben à 100  $\mu\text{M}$  Substrat aus. Eine Probe des Aldehyds wurde per LCMS analytisch untersucht und zeigte die hohe Reinheit des Substrats.

Anschließend konnte das eigentliche Experiment durchgeführt werden, nämlich die Umsetzung des Aldehyds durch LgrE unabhängig von einem gekoppelten Assay. Dabei wurden der Aldehyd und LgrE wahlweise ohne Elektronendonator, mit NADH und mit NADPH jeweils in Dreifachbestimmung inkubiert und nach Proben-aufbereitung per LCMS untersucht (s. Abb. 5-33). Die Proben ohne Elektronendonator und mit NADH wiesen keinen Unterschied zum Chromatogramm des aufgereinigten Aldehyd-Substrates auf, und auch die Massenspektren bestätigten, daß es sich in allen Fällen bei dem Peak um den Aldehyd handelte ( $\text{M}+\text{H}^+$  700,4; errechnet  $\text{M}+\text{H}^+$  700,2). Das Spektrum der Proben mit NADPH sah ebenfalls unverändert aus, jedoch zeigten die Massendaten, daß es sich bei dem Peak eindeutig um den Alkohol handelte ( $\text{M}+\text{H}^+$  702,5; errechnet  $\text{M}+\text{H}^+$  702,2). Es war keinerlei Aldehyd mehr nachweisbar in diesen Proben. Alkohol und Aldehyd hatten eine sehr ähnliche Retentionszeit, daher das fast gleiche UV-Spektrum. Es stand zweifelsfrei fest, daß LgrE eine NADPH-abhängige Aldoreduktase ist.



**Abbildung 5-33:**

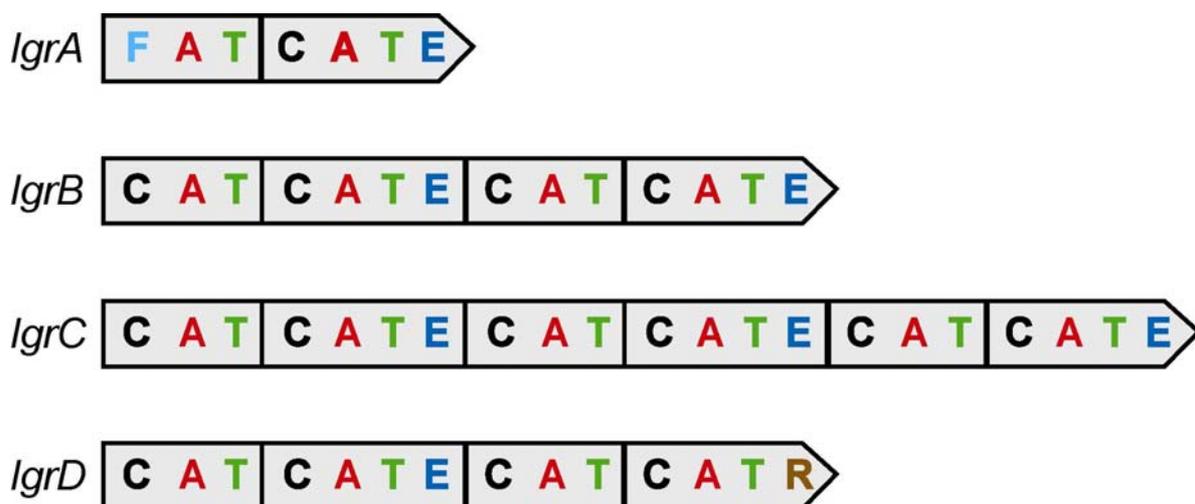
Assay mit LgrE und dem gereinigten Aldehyd-Substrat. Rot, mit NADPH; schwarz, mit NADH. Oben, total ion-chromatogramm. Unten, Massenspektrogramm.

## 6 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden die Biosynthesegene für das Peptidantibiotikum Gramicidin A identifiziert und sequenziert. Anschließend wurde die nichtribosomale Peptidsynthetase analysiert und die Kolinearität zwischen Modulen und Produkt biochemisch nachgewiesen. Zum Abschluß wurde der terminale Schritt in der Biosynthese von Gramicidin, eine zwei-Schritt-Reduktion zum Alkohol, aufgeklärt. Es konnte die aufeinanderfolgende Arbeitsweise der C-terminalen Reduktase-Domäne von LgrD und der externen Aldoreduktase LgrE durch biochemische Untersuchungen nachgewiesen werden.

### 6.1 Der *lgr* – Genkluster

Insgesamt wurden fast 74 kb genetische Information durch die Fosmide erhalten, was ungefähr 2% des Genoms von *Bacillus brevis* ATCC 8185 entsprechen dürfte. 61 kb davon enthielten die vier ORFs *lgrABCD*, die für nichtribosomale NRPS kodieren. Die zugehörigen Genprodukte LgrA (258 kDa), LgrB (578 kDa), LgrC (866 kDa) und LgrD (567 kDa) kodieren für je 2, 4, 6 und 4 Module (s. Abb. 7-1). Am N-Terminus von LgrA wurde ein Bereich von etwa 200 AS gefunden, der für eine putative N-Formyltransferase-Domäne kodiert. Am C-Terminus von LgrD wurde statt der häufig vorkommenden Thioesterase-Domäne eine Reduktase-Domäne gefunden. Die 16 Module enthalten 56 Domänen in einer Anordnung, die typisch für



**Abbildung 6-1:**

*lgrABCD* kodieren für vier NRPSs, die aus 16 Modulen mit insgesamt 56 Domänen bestehen.

lineare NRPS ist. Die Domänenabfolge für LgrA lautet F-A-PCP-C-A-PCP-E, für LgrB (C-A-PCP-C-A-PCP-E)<sub>2</sub>, für LgrC (C-A-PCP-C-A-PCP-E)<sub>3</sub> und für LgrD C-A-PCP-C-A-PCP-E-C-A-PCP-C-A-PCP-R. Bis auf die zusätzliche E-Domäne in LgrA und die Verteilung der Module auf nur 4 statt auf 7 Enzyme stimmte die gefundene NRPS mit dem in dieser Arbeit postulierten Modell überein und ist dem Typ A, lineare NRPS, zuzuordnen.

## 6.2 Die A-Domänen

Es wurden 16 A-Domänen in den 16 Modulen der Gramacidin-NRPS identifiziert. Um die Kolinearität von NRPS und Produkt zu zeigen, wurde zunächst der Spezifitätscode aller 16 A-Domänen bestimmt (7). Bis auf die putativ Trp-aktivierenden Module 9, 11, 13 und 15 sowie die Alanin-aktivierenden Module 3 und 5 stimmte die Vorhersage mit der Aminosäure an der entsprechenden Position im Produkt gut überein. Die Tatsache, daß die Vorhersage bei den Trp-aktivierenden A-Domänen versagte, liegt höchstwahrscheinlich an der Tatsache, daß bislang erst zwei A-Domänen mit dieser Spezifität identifiziert wurden (CDA-NRPS aus *Streptomyces coelicolor*, (61)). Ebenfalls wurde bereits zuvor festgestellt, daß die Vorhersage für Alanin- und Glycin-aktivierende A-Domänen schwierig ist. Dies liegt an der geringen Größe der Aminosäuren, die mehrere Gestaltungsmöglichkeiten der Substratbindetasche und somit des Spezifitätscodes zulassen (63).

Je mehr A-Domänen in Zukunft charakterisiert und in Datenbanken erfaßt werden, um so genauer werden die Vorhersagen sein können.

Um biochemische Daten zur Unterstützung der theoretischen Analyse zu erhalten, wurden die ersten drei Module kloniert, heterolog in *E. coli* überproduziert und durch Ni<sup>2+</sup>-Affinitätschromatographie gereinigt. Die biochemische Analyse zeigte, daß die A-Domäne von LgrA1 Valin (100%), Isoleucin (48%) und in geringem Umfang Leucin (12%) aktivierte. Kinetische Untersuchungen zeigten, daß bei der Aktivierung Valin ( $K_m=0,8$  mM) Isoleucin ( $K_m=2,4$  mM) vorgezogen wird; der  $K_m$ -Wert für Leucin wurde nicht bestimmt, weil er sehr hoch liegt (höher als 20 mM). Die A-Domäne von LgrA2 aktivierte ausschließlich Glycin (100%). Die PCPs beider Module konnten *in vitro* mit den jeweils aktivierten Aminosäuren beladen werden.

Damit paßte LgrA sowohl zum aufgestellten Modell als auch zur biochemischen Charakterisierung des Enzyms, das Akashi *et al.* 1977 aufreinigten und daß für die Initiation der Biosynthese von Gramacidin verantwortlich sein sollte (64). Im gleichen Jahr fanden Akers *et al.* zwei Enzyme, die zusammen die Synthese des ersten

Drittels der Gramicidin-Peptidkette *in vitro* katalysierten (55); auch hier passen die Ergebnisse für LgrA zum ersten der beiden beschriebenen Enzyme. Bei dem zweiten Enzym sollte es sich um LgrB handeln, wenn auch damals die Größe und Domänenkomposition offenbar falsch berechnet wurden (s. 5.1.1).

### 6.3 Die F-Domäne

Das Vorhandensein einer Formyltransferase-Domäne in der Gramicidin-NRPS war aufgrund des N-formylierten Valinrestes am N-Terminus von Gramicidin vermutet worden. Tatsächlich konnte eine putative F-Domäne am N-Terminus von LgrA identifiziert werden.

Sequenzvergleiche mit FMTs des Primärstoffwechsels verschiedener Bakterien zeigten ein Sequenzmotiv im N-terminalen Bereich aller Enzyme, daß generell bei N<sup>10</sup>-FormylTHF-verbrauchenden Enzymen vorzukommen scheint, nämlich IN(VI)HxSLLPxxRG.

Weiter wurde aufgrund der Sequenzanalyse der F-Domäne und Vergleich mit der anderen F-Domäne in ApdA aus *Anabaena* Stamm 90 herausgefunden, daß letztere kleiner war als zuvor von Rouhiainen *et al.* angenommen (37). Der 350 AS C-terminale Bereich der F-Domäne von ApdA ist nämlich das C-terminale Fragment einer stark degenerierten C-Domäne. Dies könnte der Grund dafür sein, daß das Enzym trotz vielfältiger Versuche während der Diplomarbeit nicht aktiv in *E. coli* überproduziert werden konnte (48); vermutlich erschwert diese Rest-C-Domäne die Faltung des Proteins erheblich.

Das große Problem bei der biochemischen Charakterisierung der F-Domäne von LgrA war die Synthese des Kofaktors. FormylTHF ist nur 48 h bei -20 °C stabil und ist daher nicht kommerziell erhältlich. Dieser konnte aber dank des Enzyms FOLD der Arbeitsgruppe Thauer *in situ* auf enzymatischem Weg hergestellt werden (60), wobei die Formylgruppe radioaktiv markiert werden kann durch den Einsatz von <sup>14</sup>CH<sub>2</sub>O im Syntheseassay. Allerdings konnte beim durchgeführten Aktivitätstests von LgrA1 kein Unterschied zu den Negativkontrollen festgestellt werden. Dies könnte am sehr hohen Formaldehyd-Gehalt des Assays liegen (Endkonzentration: 50 mM), der zum *cross-linking* zwischen den Proteinen führen kann, wodurch die enzymatische Aktivität des Proteins inhibiert wird (65). Eine Reinigung des <sup>14</sup>C-FormylTHF mittels HPLC wäre wünschenswert, ist aber im Isotopenlabor mangels HPLC nicht möglich. Eine Aufreinigung über Säulenchromatographie ist dort aus denselben Gründen ebenfalls nicht möglich.

Zukünftige Ansätze für die biochemische Charakterisierung der F-Domäne könnten die Produktanalyse mittels HPLC-MS oder FTICR/MS beinhalten. Dank neuester Technologien können nun mit FTICR/MS auch Proteine im Massenbereich von 100 kDa bei genügend hoher Konzentration vermessen werden, so daß unterschieden werden kann, ob Valin oder N-formyl-Valin am PCP des Enzyms gebunden ist. Desweiteren soll der Kofaktor formyl-THF nach Synthese präparativ aufgereinigt werden und beim Beladungsassay für LgrA1 in reiner Form zugegeben werden, so daß kein Formaldehyd mehr im Reaktionsgemisch mehr enthalten wäre. Nach alkalischer Thioesterspaltung könnten dann die entstandenen Produkte per HPLC-MS nachgewiesen werden. Zukünftige Untersuchungen innerhalb der Arbeitsgruppe sollen hier eine eindeutige Antwort geben, die in dieser Arbeit aus Zeitgründen nicht möglich war.

#### **6.4 Die E-Domäne von LgrA**

E-Domänen sind in bakteriellen NRPS-Systemen für das Vorhandensein von D-Aminosäuren im Produkt verantwortlich (27). Für jede D-Aminosäure in Gramacidin konnte im zugehörigen NRPS-Modul auch eine E-Domäne gefunden werden. Erstaunlicherweise wurde auch im zweiten Modul, LgrA2, eine E-Domäne gefunden. Dieses Modul aktiviert ausschließlich Glycin, eine achirale Aminosäure, bei der keine L- oder D-Form existiert. Dadurch konnte keine biochemische Untersuchung zur Epimerisierungsaktivität durchgeführt werden. Nur wenn die A-Domäne eine Nebenspezifität für eine L-Aminosäure gezeigt hätte, hätte untersucht werden können, ob diese in die D-Form überführt wird und somit ob die E-Domäne katalytisch aktiv ist.

Basierend auf den Tatsachen, daß der katalytisch essentielle Histidinrest im konservierten Bereich E2 von LgrA2E fehlt, sowie daß auch die übrigen konservierten Bereiche stark degeneriert sind, ist es möglich, daß diese E-Domäne über keine racemisierende Aktivität mehr verfügt.

Aufgrund der hohen Ähnlichkeit dieser A-Domäne mit der von LgrB1, die Alanin (50%;  $K_m = 1,5$  mM) und Glycin (100%;  $K_m = 2,2$  mM) aktiviert, kann spekuliert werden, daß die A-Domäne von LgrA2 früher ebenfalls Alanin aktiviert hat, so daß an Position 2 von Gramacidin A D-Alanin gefunden worden wäre. Es wird vermutet, daß sich im Laufe der Evolution die Spezifität der A-Domäne zu Glycin hin verschoben hat, welches sich von Alanin nur durch Flexibilität im Rückgrat sowie durch Fehlen der Methyl-Seitengruppe unterscheidet. Diese Veränderung könnte für das Molekül

bei der Dimerisierung wichtig sein, da diese Kopf-zu-Kopf geschieht, also auch das Glycin an Position 2 aktiv daran teilhat.

Für diese Theorie spricht auch die schlechte Konservierung der E-Domäne, da diese nach permanenter Änderung der Spezifität der A-Domäne von Alanin nach Glycin nicht mehr benötigt wurde. Dadurch war möglicherweise der Selektionsdruck auf die E-Domäne vermindert. Die E-Domäne wird wahrscheinlich im bestehenden System noch für die Kommunikation mit der C-Domäne von LgrB1 benötigt.

## 6.5 Die R-Domäne

R-Domänen werden im Vergleich zu TE-Domänen eher selten zur Produktabspaltung in bakteriellen NRPSs gefunden. Bislang wurden lediglich zwei R-Domänen, MxcG aus *Stigmatella aurantiaca* SG a15 und Lys2 aus *Saccharomyces cerevisia*, biochemisch charakterisiert (20, 23). Zwei weitere R-Domänen, SafA aus *Myxococcus xanthus* und NcpB aus *Nostoc sp.* ATCC 53789, wurden beschrieben, jedoch stehen biochemische Untersuchungen noch aus (24, 25).

Zunächst wurde aufgrund der hohen Ähnlichkeit der R-Domäne von LgrD mit der von MxcG aus *Stigmatella aurantiaca* SG a15 angenommen, daß die Gramicidin-R-Domäne ebenfalls eine zwei-Schritt-Reduktion katalysieren würde, nämlich des am letzten PCP gebundenen Hexadekapeptids. Die zwei-Schritt-Reduktion der C-terminalen Aminosäure Glycin würde zum Ethanolamin führen.

Leider konnten die biochemischen Untersuchungen nicht mit dem nativen Gramicidin gekuppelt an einen SNAC oder an CoA durchgeführt werden. Wahrscheinlich wegen der sehr hohen Hydrophobizität des Moleküls Gramicidin ist es auch in Kooperation mit Jochen Pfeiffer vom Arbeitskreis Prof. Dr. U. Koert nicht gelungen, dieses an CoA zu kuppeln. Es wird aber davon ausgegangen, daß aufgrund der Größe von Gramicidin die Substratbindetasche der R-Domäne auf keinen Fall das gesamte Hexadekapeptid vor der Reduktionsreaktion aufnehmen kann. Vermutlich geschieht die Erkennungsreaktion der R-Domäne über die C-terminalen Aminosäuren des Substrats. Daher wurden alle Untersuchungen mit einem verkürzten Pentapeptid durchgeführt, das aus den letzten fünf Aminosäuren des Hexadekapeptids vor Abspaltung von der NRPS besteht.

Erste biochemische Versuche mit einem verkürzten Pentapeptid, daß an einen SNAC gekuppelt wurde, schlugen fehl, da die R-Domäne offenbar solche Substrate nicht akzeptiert. Beim zweiten Ansatz wurde das Pentapeptid an CoA gekuppelt und von der 4'Pant-Transferase Sfp auf das der R-Domäne benachbarte PCP beladen.

Hier konnte nach Zugabe von NADPH eine Produktbildung beobachtet werden, allerdings konnte nur das Aldehyd-Produkt nachgewiesen werden. Dies wies auf eine ein-Schritt-Reduktionsreaktion der R-Domäne hin.

Der Nachteil dieses Assays ist allerdings, daß es sich hier nur um eine *single turnover* Reaktion handelt, d.h. es können keine Kinetiken und Umsatzraten bestimmt werden. Ebenfalls bedeutet dies, daß große Mengen Enzym eingesetzt werden müssen, um genügend Substrat in Produkt umzuwandeln, daß per HPLC analysiert werden kann. Typischerweise genügte das Protein, daß nach Überproduktion in 5L *E. coli* erhalten wurde, für etwa 20 bis 25 Assays.

Interessanterweise wurde auch eine Instabilität des Proteins gegenüber  $Mg^{2+}$ - und  $Mn^{2+}$ -Ionen beobachtet. Diese trat nach etwa 48-60 Stunden nach Aufschluß der *E. coli*-Zellen auf und führte zum Ausfallen des gesamten Proteins nach Zugabe eines der beiden Ionen. Die Endkonzentration von 500  $\mu M$   $Mg^{2+}$  bzw. 500 nM  $Mn^{2+}$  genügte dabei. Ohne Zugabe der Ionen konnte das Protein über Wochen im Kühlschrank aufbewahrt werden, ohne das ein Ausfallen beobachtet werden konnte.

Im gesamten gemessenen pH-Bereich von 5 bis 8 konnte die Aldehyd-Bildung in vergleichbaren Mengen beobachtet werden. Erwartungsgemäß stieg das Hydrolyse-Nebenprodukt mit dem pH-Wert an, da Thioester unter alkalischen Bedingungen zunehmend instabiler werden. Also hydrolysiert das überschüssige CoA-Substrat desto leichter, desto höher der pH-Wert ist. Bei pH 6 war das Nebenprodukt gering, und die Enzyme Sfp und R-Domäne schienen optimal zu arbeiten, so daß diese Bedingungen als Standardbedingungen für alle folgenden Assays definiert wurden.

Eine Durchführung des Assays mit NADH als Elektronendonator zeigte, daß NADH ebenfalls von der R-Domäne als Kofaktor akzeptiert wird; es konnte kein Unterschied zum Assay mit NADPH beobachtet werden.

Weder die Variation der C-terminalen Aminosäure noch die Stereokonfiguration der übrigen 4 Aminosäurereste der Peptidkette hatte einen detektierbaren Einfluß auf die Reaktion der Reduktase; mit verschiedenen Substraten (s. Tabelle 5-3) wurde das jeweilige Aldehyd-Produkt nachgewiesen.

Anhand der vorliegenden Ergebnisse wird gefolgert, daß die R-Domäne nur eine geringe Substratspezifität aufweist. Da normalerweise die A-Domänen bei NRPS die Substratspezifität bestimmen und auch die C-Domänen noch einen gewissen Einfluß auf diese haben, ist eine hohe Substratspezifität der R-Domäne nicht notwendig. Würde die Reduktase das Substrat aufgrund einer falsch eingebauten Aminosäure

nicht akzeptieren, so käme die gesamte Biosynthese zum Erliegen, bis die Thioesterase vom Typ II die Peptidkette vom PCP hydrolysiert (38, 39). Im Unterschied zum nativen Produkt wäre nur der C-Terminus der letzten Aminosäure Glycin betroffen, der statt aus einem Aldehyd dann aus einer Carbonsäure bestehen würde.

Insgesamt ist also eine relaxierte Substratspezifität deutlich von Vorteil, wie sie in den *in-vitro* Assays auch beobachtet werden konnte. Generell findet man bei Biosynthesewegen die für die Substratspezifität zuständigen Elemente eher am Anfang als am Ende der Synthesemaschinerie.

Die geringe Substratspezifität macht die Reduktase-Domäne auch zu einem idealen Kandidaten für die Konstruktion von Hybrid-NRPS *in vitro* und *in vivo*, so daß lineare Peptide mit vor Abbau geschützten C-Termini generiert werden können.

Von den vier bislang beschriebenen R-Domänen katalysiert nur MxcG eine zwei-Schritt-Reduktion zum Alkohol, wobei aber auch eine bestimmte Menge Aldehyd-Intermediat freigesetzt werden muß, das dann von MxcL transaminiert wird (21). Die R-Domäne von LgrD reiht sich funktionell bei Lys2, SafA und NcpB ein, die alle ihre Substrate nur bis zum Aldehyd reduzieren. Interessanterweise sind diese Aldehyd-Produkte jedoch immer nur ein Intermediat, was durch ein folgendes Enzyme oder intramolekulare Zyklisierung rasch weiter umgesetzt wird.

Um den von der letzten NRPS LgrD abgespaltenen Aldehyd Gramacidin-COH zum unreaktiven Alkohol zu reduzieren, schien ein weiteres Enzym nötig zu sein, was die Reaktion *in trans* ausführen müßte.

## 6.6 Die Aldoreduktase LgrE

Nach den Ergebnissen der Untersuchungen zur R-Domäne wurde gezielt nach einem externen Enzym gesucht, das den letzten Reduktionsschritt katalysieren würde. 2,2 kb *upstream* von *lgrA* konnte die putative Oxidoreduktase der Aldo-/Ketoreduktase-Familie, *lgrE*, lokalisiert werden. Diese schien ein guter Kandidat für die weitere Umsetzung des Aldehyds zu sein und sollte biochemisch charakterisiert werden.

Da es zwei putative Startkodons innerhalb des ORFs gab, wurden beide möglichen Gene, *lgrE\_short* und *lgrE\_long*, kloniert, in *E. coli* überproduziert und mittels Ni<sup>2+</sup>-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Da es vor dem zweiten Startkodon eine putative RBS gefunden wurde, war es nicht verwunderlich, daß auch nur das Protein LgrE\_short löslich war. Allerdings mußte die Überproduktion spätestens 2,5h nach

Induktion abgestoppt werden, da danach die gesamte *E. coli* - Kultur in eine Absterbephase überging. Vermutlich ist die Überproduktion der Aldoreduktase toxisch für die Zelle.

In einem gekoppelten Assay konnte *in vitro* gezeigt werden, daß LgrE tatsächlich die Umsetzung des Aldehyds zum Alkohol katalysiert. Somit handelt es sich bei LgrE um eine *in trans* arbeitende Aldoreduktase, die den letzten Schritt der Biosynthese von Gramacidin katalysiert. Diese Art der Produktfreisetzung unter Katalyse von zwei verschiedenen Reduktasen wurde zuvor bei NRPS noch nicht beschrieben.

Es wurden auch die anderen Substrate (s. Tabelle 5-3) in gekoppelten Assays eingesetzt; dabei zeigte sich nur bei zwei Substraten eine verminderte Umsetzung durch LgrE. Das Substrat Ac-DLeu<sub>12</sub>-LTrp<sub>13</sub>-DLeu<sub>14</sub>-LTrp<sub>15</sub>-LAsp<sub>16</sub>-CHO wurde nur zu etwa 5% umgesetzt, und das Substrat Ac-DLeu<sub>12</sub>-DTrp<sub>13</sub>-DLeu<sub>14</sub>-DTrp<sub>15</sub>-Gly<sub>16</sub>-CHO zu etwa 50%. Alle anderen Substrate wurden komplett vom Aldehyd zum Alkohol umgesetzt.

Die Aminosäuren, die statt Glycin<sub>16</sub> für Untersuchungen des Einflusses der C-terminalen Aminosäure auf die Substratspezifität in die Peptidkette eingebaut wurden, wurden aufgrund ihrer besonderen Eigenschaften ausgesucht. Es wurden dafür Beispiele für geladene (Lys, Asp), aliphatische (Leu) und große bzw. aromatische (Phe) Seitengruppen ausgewählt.

Vermutlich entsteht durch den negativ geladenen Aspartatrest am C-Terminus des nur zu 5% akzeptierten Peptids ein Konflikt in der Substratbindetasche von LgrE; dieser trat nur bei einem weiteren Substrat auf. Die um 50% verminderte Akzeptanz des sterisch modifizierten Substrates, Ac-DLeu<sub>12</sub>-DTrp<sub>13</sub>-DLeu<sub>14</sub>-DTrp<sub>15</sub>-Gly<sub>16</sub>-CHO, deutet auf einen weiteren Faktor bei der Substratspezifität hin, der möglicherweise mit der Konformation des Substrates in Zusammenhang steht.

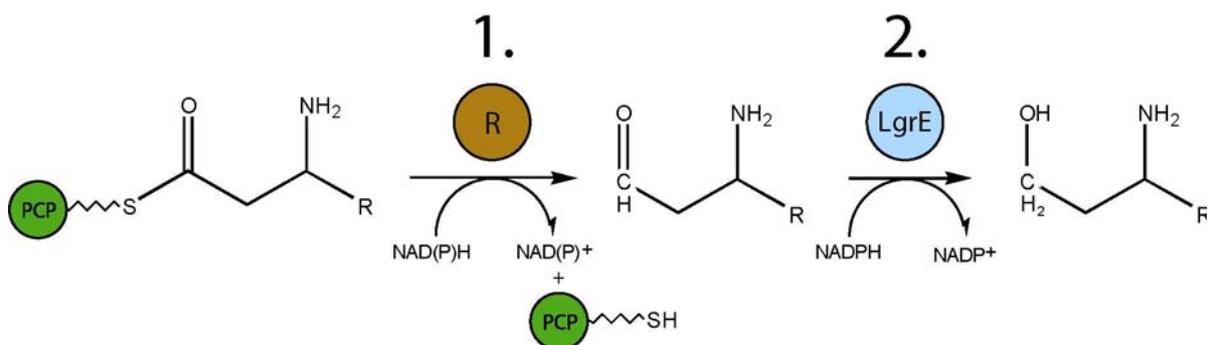
Um die Aldoreduktase unabhängig von einem gekoppelten Assay untersuchen zu können, sollte das Aldehyds substrat chemisch synthetisiert werden. Trotz drei verschiedener Ansatzweisen konnte das gewünschte Produkt jedoch nicht erhalten zu werden. Vermutlich handelte es sich bei den C-Termini trotz der Aktivierung immer noch um schlechte Nucleophile. Stärkere Reduktionsmittel wie Lithium-Aluminiumhydrid können bei Peptidchemie nicht eingesetzt werden, da die Gefahr besteht, daß Seitenketten (hier: Tryptophan) oder sogar die Peptidbindungen reduziert werden; ebenso könnte unter stark reduzierenden Bedingungen statt dem gewünschten Aldehyd der Alkohol erhalten werden.

Die enzymatische Synthese hingegen gelang wie erwartet gut, jedoch nur mit sehr geringer Ausbeute. Mit Hilfe dieses sehr reinen Substrats konnte bestätigt werden, daß LgrE eine NADPH-abhängige Aldoreduktase ist, die NADH nicht als Kofaktor akzeptiert. Insgesamt weist die zweite Reduktase LgrE eine leicht höhere Substratspezifität auf als die R-Domäne auch mit Hinblick auf den Kofaktor. Da LgrE *in trans* agiert und das frei diffundierbare Substrat akzeptieren kann, macht diese erhöhte Spezifität gegenüber der R-Domäne Sinn, da letztere in die Biosynthese fest eingebunden ist und ihr Substrat nicht auswählen können muß.

Freie Aldehyde sind thermodynamisch stärker aktiviert und agieren in einem biologischen Milieu als ungewollte Elektrophile. Daher werden Aldehyde in der Zelle schnell zum Alkohol reduziert (MxcG), transaminiert (MxcL), intramolekular zyklisiert (Lys2(23), SafA, NcpB) oder oxidiert zur stabilen Carbonsäure (U26 (26)).

Interessanterweise kodiert das erste Enzym des Myxochelin-Genclusters, *mxmA*, für eine putative Oxidoreduktase der Aldo-/Ketoreduktasefamilie. Ohne die biochemischen Daten der *in vitro* Rekonstitution wäre auch für MxcG eine ein-Schritt-Reduktion zum Aldehyd zu erwarten gewesen, und im Anschluß wäre das Intermediat entweder von MxcA reduziert oder von MxcL transaminiert worden. Dies ist jedoch nicht der Fall (20); die Funktion von MxcA konnte bislang nicht geklärt werden. LgrE fügt sich in dieses Schema nahtlos ein, indem es das Gramacidin-CHO-Intermediat zum unreaktiven Alkohol Gramacidin A reduziert. Abb. 6-2 zeigt eine Zusammenfassung der Reaktionsmechanismen der in dieser Studie untersuchten Reduktasen.

Warum bei Gramacidin zwei Reduktasen zum Einsatz kommen, obwohl eine theoretisch genügt (zwei-Schritt-Reduktion wie bei MxcG), ist unbekannt. Es zeigt jedoch, daß die Natur offenbar mehrere Biosynthesestrategien parallel entwickelt hat, die jede für sich erfolgreich zur gewünschten Produktbildung führt.

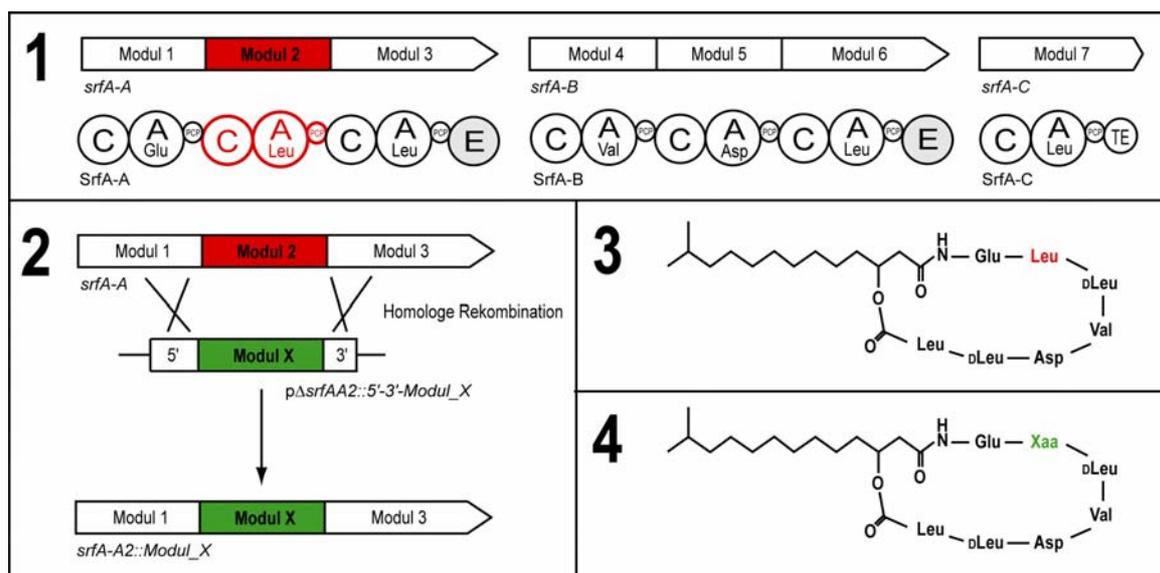


**Abbildung 6-2:**

Die Ergebnisse zur Untersuchung der Abspaltung von Gramacidin von der letzten NRPS LgrD. Die erste Reduktase arbeitet *in cis*, die zwei *in trans* bei den aufeinanderfolgenden Reduktionsschritten.

## 7 Studie – Etablierung einer neuen genetischen Methode für Modulaustausche in NRPS - Systemen

Surfactin wird von einigen *Bacillus*-Stämmen produziert, darunter *B. subtilis* ATCC 21332. Da dieser Stamm genetisch gut zugänglich ist und das Surfactin-Biosyntheseoperon genetisch und biochemisch umfangreich charakterisiert wurde, dient es als Modellsystem zur gezielten Veränderung von Peptidsynthetasen zur Synthese neuer Produkte *in vivo* (s. Abb. 7-1). Bereits 1995 wurden erste Versuche von Stachelhaus et al. durchgeführt (66). Dabei wurde das AT-Minimalmodul Nr. 7 der Surfactinsynthetase SrfA-C auf DNA-Ebene im *srfA-C* Gen gegen AT-Module mit anderer Substratspezifität ausgetauscht. Es konnten die vorhergesagten Surfactinvarianten nachgewiesen werden, jedoch war die Produktausbeuten extrem niedrig (0,1 – 0,5% im Vergleich zum Wildtyp). Dies scheint nach heutigen Erkenntnissen vor allem durch die Wahl ungeeigneter Schnitt- und Fusionsstellen beim Austausch erklärbar zu sein. Durch intensive Forschung in den letzten Jahren am modularen Aufbau von nichtribosomalen Peptidsynthetasen sowie an der Domänenstruktur dieser Module konnte eine verbesserte Strategie für Modulaustausche ausgearbeitet werden ((67-70), s. Abb. 7-1). Als Module wurden Einheiten aus C-Domäne, A-Domäne und PCP definiert (CAT-Module, (69)). Gemäß der Definition des Linkerbereiches zwischen PCPs und C-Domänen werden die



**Abbildung 7-1:**

1, Surfactin-Gene *srfAABC* und zugehörige NRPS. 2, Modulaustausche auf genetischer Ebene finden im Linkerbereich zwischen PCP und C-Domäne statt durch homologe Rekombination mit entsprechenden Plasmiden. 3, Surfactin. 4, Surfactin nach erfolgreichem Modulaustausch an Position 2.

Aminosäuren 38 und 39 nach dem invarianten Serin im Core T des PCP als Schnitt- und Fusionsstelle ausgewählt.

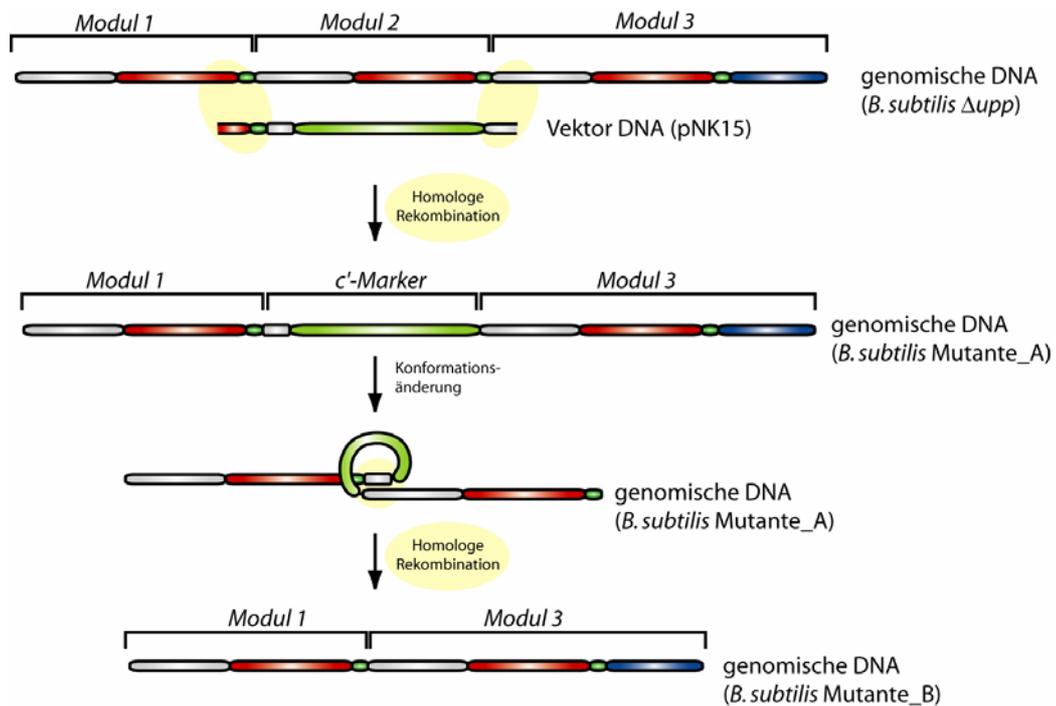
Der limitierende Schritt ist jedoch immer noch die Effizienz der genetischen Manipulation der Gene.

2002 präsentierte Céline Fabret von der Gruppe Ehrlich, INRA (Frankreich) eine neue Methode zur positiven Selektion auf den Verlust eines Gens in *B. subtilis* MR 168 auf einem Poster (71). Diese Methode wurde im Rahmen der Experimente für den Austausch von Modul 2 in der Surfactin-NRPS getestet, jedoch ohne Erfolg.

Im Sommer 2003 wurde auf der „Conference on functional genomics of gram positive microorganisms“ in Baveno ein Poster von Filee *et al.* ausgestellt, auf dem eine weitere Strategie zur positiven Selektion in *B. subtilis* vorgestellt wurde (72). Auf den ersten Blick war klar, daß diese sehr viel aufwendiger ist mit Hinblick auf zu konstruierende Konstrukte und Stämme. Da auch zunächst noch keine Publikationen zu dieser Methode vorlagen, wurde entschieden, diese vorerst nicht zu versuchen.

Allerdings fiel bei Betrachtung des Posters auf, daß hier ebenfalls wie bei der *upp*-Methode der letzte Schritt der Strategie darin bestand, eingeführte Marker durch eine homologe Rekombination über *direct repeats* zu entfernen (*loop-out* oder *single cross-over*). Filee *et al.* verwendetet 138 bp für diese *direct repeats*, Fabret *et al.* sogar nur 30 bp. Aus dieser Beobachtung heraus entstand die Idee, den Modulaustausch auf eine völlig neue Art und Weise zu versuchen. Als Nachteil wurde in Kauf genommen, daß es sich hierbei nicht um eine Selektion, sondern nur um eine *screening*-Methode handelt.

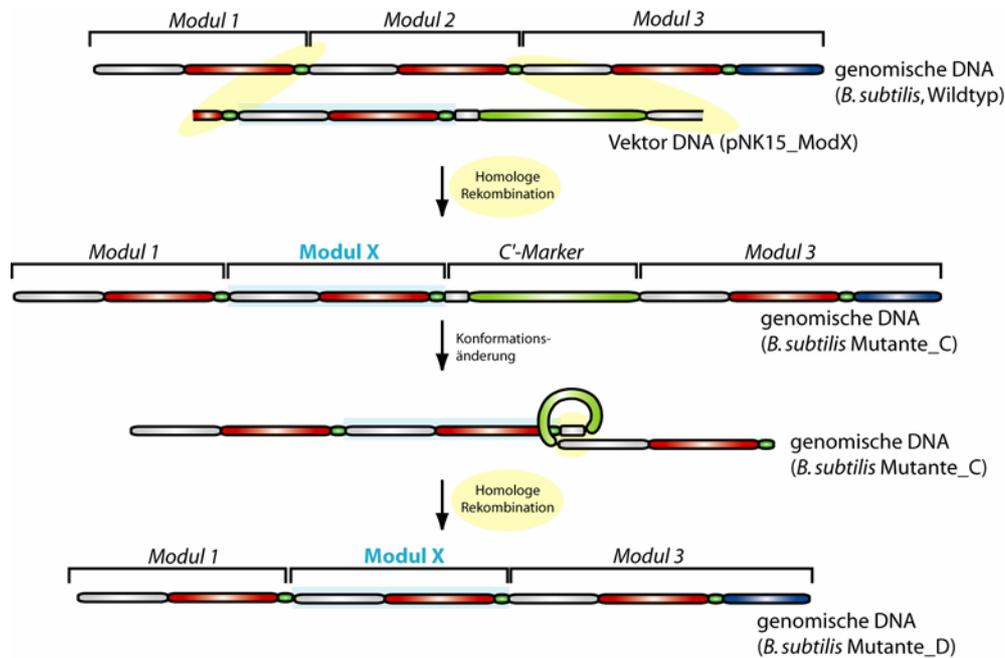
Wie aus Abb. 7-2 ersichtlich ist, muß daß Element *C'-cat* mittels *double cross-over* zwischen Modul 1 und Modul 3 integriert werden. *C'* entspricht den ersten 300 bp der C-Domäne von Modul 3; *cat* verleiht Resistenz gegen Chloramphenicol. Auf die Integration des Fragments kann mit Chloramphenicol selektioniert werden. Anschließend wird überprüft, ob es sich tatsächlich um einen *double cross-over* handelt oder nur um einen unerwünschten *single cross-over*. Der richtige Klon wird dann anschließend für mindestens 20 Generationen in LB- oder Minimalmedium gezogen (tägliches Überimpfen in frisches Medium für 5 Tage) und anschließend ausplattiert. Nach Umstemplen auf Cm-haltige Platten sollten diejenigen Kolonien nicht mehr wachsen, bei denen das Ereignis des Ausloopens stattgefunden hat, wobei Modul 1 und Modul 3 *in frame* fusioniert werden. Im Erfolgsfall kann die Strategie dann für die Einbringung beliebiger Module oder Dimodule in den *srfAA2*-

**Abbildung 7-2:**

Integration des C'-cat-Fragments und gleichzeitige Eliminierung von Modul 2; Konformationsänderung; Ausloopen des C'-cat-Fragments bei gleichzeitiger *in frame* Fusion von Modul 1 und Modul 3.

Lokus verwendet werden, wie Abb. 7-3 zeigt. Die Klonierungsmöglichkeiten sind theoretisch nur durch die Anzahl der verfügbaren Module beschränkt.

Zunächst wurde der Austauschvektor pNK15 (pTZ18-5'-3'-Δ*srfAA2*::C'-*cat*) generiert werden. Dabei ist zu beachten, daß es nur eine einzige Restriktionsschnittstelle für alle Klonierungen gibt, die auch für weitere Klonierungen von Modulen und Dimodulen in den Austauschvektor erhalten bleiben muß, nämlich *Bam*HI.. Für die Klonierungen wird dabei ausgenutzt, daß *Bgl*II und *Bam*HI kompatible Enden erzeugen, wobei nach Ligation die Erkennungssequenzen nicht wiederhergestellt werden; die Schnittstellen „verschwinden“. So können Fragmente eingefügt werden, die am 5' Ende die *Bam*HI-Schnittstelle erhalten, und am 3' Ende durch *Bgl*II/*Bam*HI-Ligation die Schnittstelle entfernen. Die komplette Strategie zur Klonierung des Austauschvektors ist in Abb. 4-1 gezeigt und in Kapitel 4.3 genau erläutert. Bei der Klonierung wurde nach der Ligation eine Transformation mit *E. coli* XL1 blue durchgeführt und standardmäßig auf Amp<sup>100</sup> Cm<sup>20</sup> ausplattiert. Es konnten jedoch keine Kolonien erhalten werden, die den richtigen Genotyp aufwiesen. Alle untersuchten Kolonien trugen das Insert C'-*cat* doppelt oder dreifach. Eine Wiederholung der Experimente brachte wieder dasselbe Ergebnis. Daraufhin wurde



**Abbildung 7-3:**

Anwendung der Strategie von Abb. 7-2 auf die Einbringung eines neuen Moduls.

der Selektionsdruck auf  $\text{Amp}^{100} \text{Cm}^5$  verringert. Nun wurden sehr viele Kolonien nach der Transformation erhalten, die fast alle das Insert nur einmal trugen. Nach Überprüfung der Orientierung des Inserts konnte der gewünschte Vektor erhalten werden. Nach Linearisierung mit *Drall* wurde der Vektor in *B. subtilis* ATCC 21332 eingebracht, und es konnte der gewünschte Stamm *B. subtilis* NS5 erhalten werden. Die Integration von *C'-cat* durch *double cross-over* konnte per PCR bestätigt werden. Von diesem Klon wurde eine Übernachtskultur ohne Antibiotikum angesetzt, mit der am nächsten Morgen 20 mL LB und 20 mL Minimalmedium inokuliert wurden. Nach 24h wurde von jedem Kolben je ein frischer Kolben angeimpft und weiter wachsen gelassen. Vom Rest der Kultur wurden Verdünnungsreihen angesetzt. Es wurden verschiedene Verdünnungen auf DSM – Agarplatten ausplattiert und ü.N. bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die erhaltenen CFUs auf DSM  $\text{Cm}^3$  – Agarplatten umgepickt und erneut bei 37 °C ü.N. inkubiert. Gleichzeitig wurden wieder Kulturen in frische Kolben überimpft, und vom Rest der Kultur wurden erneut Verdünnungsreihen angefertigt und ausplattiert. Dieses Verfahren wurde 5 Tage lang durchgeführt.

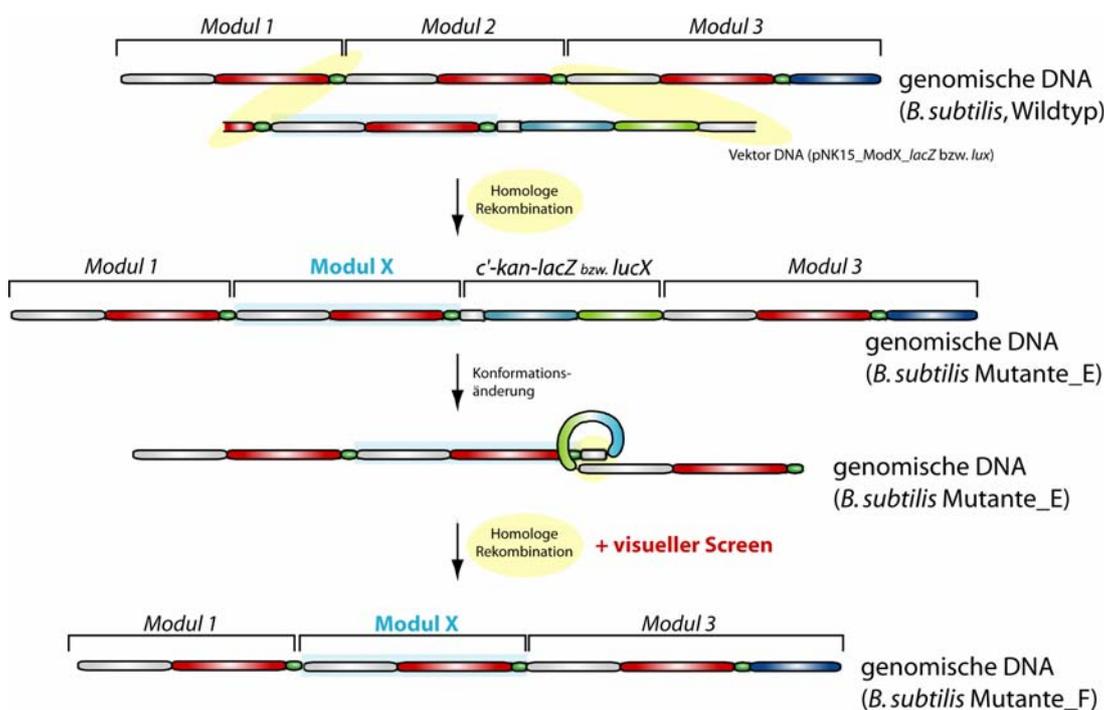
Insgesamt wurden im Rahmen dieser Studie ca. 1.500 Kolonien untersucht, jedoch konnte kein Cm-sensitiver Klon erhalten werden.

## 7.1 Ausblick zur Verbesserung der Ausloopen-Strategie

Fabret *et al.* berichteten, daß  $10^{-6}$  Kolonien je Generation über die 30 bp *direct repeats* die Marker verlieren. Es wurde angenommen, daß die Vergrößerung auf 300 bp diese Zahl deutlich verbessern würde. Dies schien jedoch noch nicht der Fall zu sein. Daher wurde eine Neuklonierung beschlossen, bei der das C'-Fragment 1.200 bp betragen soll.

Ebenfalls wurde über einen optischen Screen nachgedacht. Dafür kommen zwei Strategien in Frage, nämlich die Nutzung von LacZ und der Luciferase. Bei LacZ kann man den sogenannten blau-weiß-Screen anwenden. Tragen die Kolonien das intakte *lacZ*-Gen und exprimieren sie dieses, so können sie das Substrat X-Gal verwenden. Dabei entsteht als Abbauprodukt ein Indol-Derivat, daß den Kolonien eine blaue Farbe gibt. Enthalten die Zellen kein LacZ, so bleiben sie weiß. Auf diese Art und Weise könnten bei der Anwendung der Ausloopen-Strategie all diejenigen Kolonien, die blau werden, als richtige Kandidaten ausgeschlossen werden, und die Suche würde sich auf die weißen Kolonien beschränken.

Benutzt man statt LacZ die Luciferase, so fluoreszieren die Kolonien, die diese enthalten, nach Zugabe von Luciferin. Hier können im Screen alle fluoreszierenden Kolonien ausgeschlossen werden, und nur die übrigen werden weiter auf ihren Genotyp hin untersucht. Die verbesserte Strategie ist in Abb. 7-4 dargestellt.



**Abbildung 7-4:**

Anpassung der Ausloopen-Strategie durch Einbindung eines visuellen Screens.

Die Gene *lacZ* bzw. *lux* können in den Austauschvektor über die noch vorhandene *XmaI/SmaI*-Schnittstelle zwischen *C'* und den Resistenzmarker eingebracht werden; Voraussetzung ist lediglich, daß diese eine eigene Ribosomenbindestelle mitbringen. Diese Ansätze werden von Marcus Miethke im Rahmen seiner Doktorarbeit zur Zeit verfolgt. Nach Vergrößerung des *C'*-Fragmentes auf 1.200 bp konnte er erfolgreich nach Umstempeln und Screenen von ca. 3.000 CFUs einen Klon mit dem gewünschten Genotyp identifizieren, d.h. das Ausloopen hat stattgefunden. Die Produktion des Sechsring-Surfactin wurde ebenfalls gezeigt, so daß das *proof of principle* für diese Methode des Modulaustausches erbracht wurde.

Insgesamt bietet die Methode des Ausloopens eine Alternative zu bislang angewendeten Strategien zur Herstellung von Surfactin-Varianten durch genetische Manipulation der Biosynthesegene.

Durch Anpassen der homologen Bereiche des Austauschvektors und des *direct repeat*-Fragments kann die Strategie bei jedem anderen NRPS-Modul angewandt werden oder auch bei einzelnen Domänen oder Regionen. Dadurch werden sich weitere Ansätze für zukünftige Experimente ergeben.

## 8 Quantifizierung der Surfactin-Produktion nach Austausch der Biosynthesegene

Die Biosynthesegene für die Surfactin-NRPS liegen auf drei Genen, *srfAA*, *srfAB* und *srfAC*, die für je drei, drei und ein Modul kodieren (s. Abb. 7-1). Im Rahmen der Diplomarbeit wurde das zweite Modul, SrfAA2, auf genetischer Ebene deletiert (*B. subtilis* HM0394), mit dem nativen Modul wieder komplementiert (*B. subtilis* HM0542) sowie gegen ein analoges Modul aus der Tyrocidin-NRPS ausgetauscht (*B. subtilis* HM0519). In allen drei Fällen wurde eine funktionelle NRPS erhalten und die Produktbildung *in vivo* gezeigt (48). Es standen noch genaue Quantifizierungen aus. Zusätzlich dazu sollten die Produktionsraten mit der eines weiteren Stammes verglichen werden, *B. subtilis* TS312. Dieser wurde 1995 durch Austausch der A-Domäne mit zugehörigem PCP im 7. Modul, SrfAC, generiert (66).

Mit Hinblick auf Produktausbeuten sollte der Vorteil des Austausches von ganzen Modulen unter Nutzung der Linkerregionen zwischen diesen gegenüber Domänen-austauschen demonstriert werden. Ebenso sollte gezeigt werden, daß die bessere Definition der Linkerregionen nach heutigem Wissensstand zu guten Produktausbeuten führt. Insgesamt wurden 6 Stämme miteinander verglichen (s. Tabelle 8-1).

Zur Surfactin-Extraktion wurden alle Stämme in 200 mL SpIII-Medium bei 37 °C für 44 h inkubiert; dabei wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. 120 mL des Kulturüberstandes wurden zweimal mit je ½ Volumen Butanol extrahiert. Nach Einengung bis zur Trockne am Rotationsverdampfer wurde das Pellet in 5 mL MeOH,

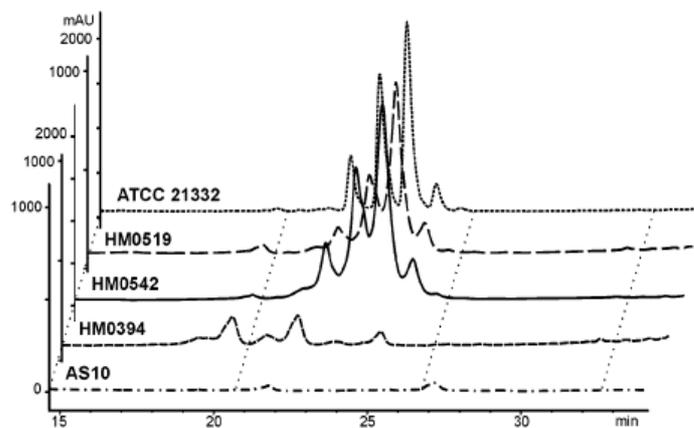
Stamm	Beschreibung	Surfactin- produktion
<i>B. subtilis</i> ATCC 21332	Wildtyp	100%
<i>B. subtilis</i> AS10	$\Delta srfAA2::cat -P_{srf}$	n.d.
<i>B. subtilis</i> HM0394	$\Delta srfAA2$	10%
<i>B. subtilis</i> HM0519	$\Delta srfAA2::leuCAT (tycC6)$	18,9%
<i>B. subtilis</i> HM0542	$\Delta srfAA2::leuCAT (srfAA2)$	60%
<i>B. subtilis</i> TS312	$\Delta srfAC-AT::leuAT (grsB4-AT)$	0,1-0,5 %

**Tabelle 8-1:**

Zur quantitativen Analyse der Surfactinproduktion verwendeten Stämme. Der Wert der Surfactinproduktion des Wildtyps wurde auf 100% gesetzt. n.d. – nicht detektierbar.

0,045% HCOOH, resuspendiert und mittels HPLC-MS analysiert und quantifiziert. Zur Quantifizierung wurde die Fläche unter den Surfactin-Peaks im jeweiligen HPLC-UV-Chromatogramm integriert. (s. Abb. 8-1). Zur visuellen Kontrolle wurden auch Experimente mit Blutagarplatten durchgeführt (s. Abb. 8-2).

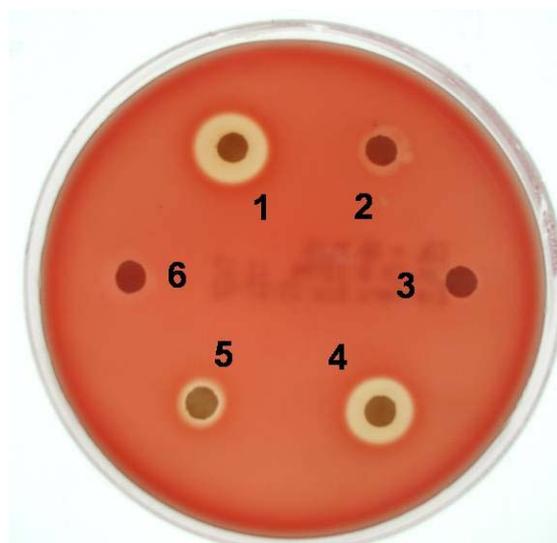
Die hier gezeigten Ergebnisse weisen darauf hin, daß Modulaustausche durch Manipulation der Biosynthesegene durchaus erfolgversprechend sind. Es konnte ein analoges Modul am Locus des nativen Moduls 2 eingebracht werden, das zu einer aktiven NRPS führte, die wieder Surfactin produzierte, nämlich 18,9% im Vergleich



**Abbildung 8-1:**

UV-Chromatogramm der Surfactinproduktion. Der Wildtyp-Extrakt wurde 1:3 verdünnt eingesetzt.

Das Vorhandensein verschiedener Peaks liegt an der variablen Länge der  $\beta$ -Hydroxy-Fettsäure, was zu unterschiedlichen Retentionszeiten der einzelnen Surfactin-Varianten führt.



**Abbildung 8-2:**

Surfactinproduktion analysiert auf Blutagarplatten. 1-WT. 2-HM0394. 3-AS10. 4-HM0542. 5- HM0519. 6-TS312. Lysierte (helle) Stellen auf der Platte spiegeln die aufgetragene Surfactinmenge wider.

zum Wildtyp. Versuche, bei denen dies an Position 2 durch Austausch des A-PCP-Didomänenpaars versucht wurde, waren nicht erfolgreich. Ein Didomänen austausch an Position 7 führte zu einer aktiven Synthetase, jedoch produzierte dieser Stamm im Vergleich zum Wildtyp lediglich etwa 0,1-0,5% Surfactin. Es zeigt sich deutlich, daß durch die korrekte Definition der Linker-Regionen zwischen den Modulen die Strategie für die Produktion von Surfactinvarianten entscheidend verbessert werden konnte. Allerdings muß eingeschränkt werden, daß zum Zeitpunkt des Didomänen austausches die Domänengrenzen noch nicht bekannt waren und erst durch Analyse der Kristallstrukturen von PheA und PCP und durch die Konstruktion von Hybrid-NRPS genau definiert wurden (1, 69, 73, 74). Es ist wahrscheinlich, daß die Produktionsrate bei Didomänen austauschen bei Verwendung der korrekten Linkerbereiche steigen würde.

Da jedoch der rekonstituierte Wildtyp, HM0542, lediglich 60% Surfactin produzierte, lag die Vermutung nahe, daß der Ausgangsstamm *B. subtilis* AS10 einen nicht näher bestimmten Defekt hat. Vergleicht man also die Produktionsraten von HM0519 direkt mit denen von HM0542, so zeigt sich etwa 40% Surfactinproduktion der Hybrid-NRPS im direkten Vergleich mit der rekonstituierten NRPS.

Dabei ist noch zu berücksichtigen, daß das heterologe Modul TycC6 zwar ebenfalls Leucin aktiviert, aber in seinem nativen Kontext ein Nonapeptid mit L-Ornithin als C-terminaler Aminosäure prozessiert sowie *downstream* mit einer Thioesterase-Domäne kommuniziert. Die erfolgreiche Integration dieses Moduls in die Surfactin-Synthetase zeigt also, daß es durchaus möglich ist, ein Modul aus einem verschiedenen Kontext heraus für Modulaustausche zu verwenden und gute Produktausbeuten zu erzielen.

## 9 Literaturverzeichnis

1. **Conti, E., Stachelhaus, T., Marahiel, M. A., and Brick, P.** (1997) *Embo J* Structural basis for the activation of phenylalanine in the non- ribosomal biosynthesis of gramicidin S. *16*, 4174-83.
2. **Finking, R., and Marahiel, M. A.** (2004) *Annu Rev Microbiol* Biosynthesis of nonribosomal peptides. *58*, 453-88.
3. **Clardy, J., and Walsh, C.** (2004) *Nature* Lessons from natural molecules. *432*, 829-837.
4. **Lipmann, F., Gevers, W., Kleinkauf, H., and Roskoski, R., Jr.** (1971) *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* Polypeptide synthesis on protein templates: the enzymatic synthesis of gramicidin S and tyrocidine. *35*, 1-34.
5. **Mootz, H. D., Schwarzer, D., and Marahiel, M. A.** (2002) *ChemBiochem* Ways of assembling complex natural products on modular nonribosomal peptide synthetases. *3*, 490-504.
6. **May, J. J., Kessler, N., Marahiel, M. A., and Stubbs, M. T.** (2002) *Proc Natl Acad Sci U S A* Crystal structure of DhbE, an archetype for aryl acid activating domains of modular nonribosomal peptide synthetases. *99*, 12120-5.
7. **Stachelhaus, T., Mootz, H. D., and Marahiel, M. A.** (1999) *Chem Biol* The specificity-conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases. *6*, 493-505.
8. **Stachelhaus, T., Hüser, A., and Marahiel, M. A.** (1996) *Chem. Biol.* Biochemical characterization of peptidyl carrier protein (PCP), the thiolation domain of multifunctional peptide synthetases. *3*, 913-921.
9. **Reuter, K., Mofid, M. R., Marahiel, M. A., and Ficner, R.** (1999) *Embo J* Crystal structure of the surfactin synthetase-activating enzyme sfp: a prototype of the 4'-phosphopantetheinyl transferase superfamily. *18*, 6823-31.
10. **Mofid, M. R., Finking, R., Essen, L. O., and Marahiel, M. A.** (2004) *Biochemistry* Structure-based mutational analysis of the 4'-phosphopantetheinyl transferases Sfp from *Bacillus subtilis*: carrier protein recognition and reaction mechanism. *43*, 4128-36.
11. **Sieber, S. A., Walsh, C. T., and Marahiel, M. A.** (2003) *J Am Chem Soc* Loading peptidyl-coenzyme A onto peptidyl carrier proteins: a novel approach in characterizing macrocyclization by thioesterase domains. *125*, 10862-6.
12. **Stachelhaus, T., Mootz, H. D., Bergendahl, V., and Marahiel, M. A.** (1998) *J Biol Chem* Peptide bond formation in nonribosomal peptide biosynthesis. Catalytic role of the condensation domain. *273*, 22773-81.
13. **Bergendahl, V., Linne, U., and Marahiel, M. A.** (2002) *Eur J Biochem* Mutational analysis of the C-domain in nonribosomal peptide synthesis. *269*, 620-9.
14. **Keating, T. A., Marshall, C. G., Walsh, C. T., and Keating, A. E.** (2002) *Nat Struct Biol* The structure of VibH represents nonribosomal peptide synthetase condensation, cyclization and epimerization domains. *9*, 522-6.
15. **Belshaw, P. J., Walsh, C. T., and Stachelhaus, T.** (1999) *Science* Aminoacyl-CoAs as probes of condensation domain selectivity in nonribosomal peptide synthesis. *284*, 486-9.

16. **Clugston, S. L., Sieber, S. A., Marahiel, M. A., and Walsh, C. T.** (2003) *Biochemistry* Chirality of peptide bond-forming condensation domains in nonribosomal peptide synthetases: the C5 domain of tyrocidine synthetase is a (D)C(L) catalyst. *42*, 12095-104.
17. **Sieber, S. A., and Marahiel, M. A.** (2003) *J Bacteriol* Learning from nature's drug factories: nonribosomal synthesis of macrocyclic peptides. *185*, 7036-43.
18. **Sieber, S. A., and Marahiel, M. A.** (2005) *Chem Rev* Molecular mechanisms underlying nonribosomal Peptide synthesis: approaches to new antibiotics. *105*, 715-38.
19. **Bruner, S. D., Weber, T., Kohli, R. M., Schwarzer, D., Marahiel, M. A., Walsh, C. T., and Stubbs, M. T.** (2002) *Structure (Camb)* Structural basis for the cyclization of the lipopeptide antibiotic surfactin by the thioesterase domain SrfTE. *10*, 301-10.
20. **Gaitatzis, N., Kunze, B., and Müller, R.** (2001) *Proc Natl Acad Sci U S A* *In vitro* reconstitution of the myxochelin biosynthetic machinery of *Stigmatella aurantiaca* Sg a15: Biochemical characterization of a reductive release mechanism from nonribosomal peptide synthetases. *98*, 11136-11141.
21. **Silakowski, B., Kunze, B., Nordsiek, G., Blocker, H., Hofle, G., and Muller, R.** (2000) *Eur J Biochem* The myxochelin iron transport regulon of the myxobacterium *Stigmatella aurantiaca* Sg a15. *267*, 6476-85.
22. **Gaitatzis, N., Kunze, B., and Muller, R.** (2005) *Chembiochem* Novel Insights into Siderophore Formation in Myxobacteria. *6*, 365-374.
23. **Ehmann, D. E., Gehring, A. M., and Walsh, C. T.** (1999) *Biochemistry* Lysine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: mechanism of alpha-aminoadipate reductase (Lys2) involves posttranslational phosphopantetheinylation by Lys5. *38*, 6171-7.
24. **Pospiech, A., Cluzel, B., Bietenhader, J., and Schupp, T.** (1995) *Microbiology* A new *Myxococcus xanthus* gene cluster for the biosynthesis of the antibiotic saframycin Mx1 encoding a peptide synthetase. *141*, 1793-803.
25. **Becker, J. E., Moore, R. E., and Moore, B. S.** (2004) *Gene Cloning, sequencing, and biochemical characterization of the nostocyclopeptide biosynthetic gene cluster: molecular basis for imine macrocyclization.* *325*, 35-42.
26. **Kasahara, T., and Kato, T.** (2003) *Nature* Nutritional biochemistry: A new redox-cofactor vitamin for mammals. *422*, 832.
27. **Stachelhaus, T., and Walsh, C. T.** (2000) *Biochemistry* Mutational analysis of the epimerization domain in the initiation module PheATE of gramicidin S synthetase. *39*, 5775-87.
28. **Linne, U., Doekel, S., and Marahiel, M. A.** (2001) *Biochemistry* Portability of epimerization domain and role of peptidyl carrier protein on epimerization activity in nonribosomal peptide synthetases. *40*, 15824-34.
29. **Linne, U., and Marahiel, M. A.** (2000) *Biochemistry* Control of directionality in nonribosomal peptide synthesis: role of the condensation domain in preventing misinitiation and timing of epimerization. *39*, 10439-47.
30. **Konz, D., Klens, A., Schorgendorfer, K., and Marahiel, M. A.** (1997) *Chem Biol* The bacitracin biosynthesis operon of *Bacillus licheniformis* ATCC 10716: molecular characterization of three multi-modular peptide synthetases. *4*, 927-37.
31. **Duerfahrt, T., Eppelmann, K., Muller, R., and Marahiel, M. A.** (2004) *Chem Biol* Rational design of a bimodular model system for the investigation of heterocyclization in nonribosomal peptide biosynthesis. *11*, 261-71.

32. **Schneider, T. L., Shen, B., and Walsh, C. T.** (2003) *Biochemistry* Oxidase domains in epothilone and bleomycin biosynthesis: thiazoline to thiazole oxidation during chain elongation. *42*, 9722-30.
33. **Schneider, T. L., and Walsh, C. T.** (2004) *Biochemistry* Portability of oxidase domains in nonribosomal peptide synthetase modules. *43*, 15946-55.
34. **Weber, G., Schörgendorfer, K., Schneider-Scherzer, E., and Leitner, E.** (1994) *Curr. Genet.* The peptide synthetase catalyzing cyclosporine production in *Tolypocladium niveum* is encoded by a giant 45.8-kilobase open reading frame. *26*, 120-125.
35. **Billich, A., and Zocher, R.** (1987) *J. Biol. Chem.* Enzymatic synthesis of cyclosporin A. *262*, 17258-9.
36. **Weckwerth, W., Miyamoto, K., Inuma, K., Krause, M., Glinski, M., Storm, T., Bonse, G., Kleinkauf, H., and Zocher, R.** (2000) *J Biol Chem* Biosynthesis of PF1022A and Related Cyclooctadepsipeptides. *275*, 17909-17915.
37. **Rouhiainen, L., Paulin, L., Suomalainen, S., Hyytiäinen, H., Buikema, W., Haselkorn, R., and Sivonen, K.** (2000) *Mol Microbiol* Genes encoding synthetases of cyclic depsipeptides, anabaenopeptilides, in *Anabaena* strain 90. *37*, 156-67.
38. **Schwarzer, D., Mootz, H. D., Linne, U., and Marahiel, M. A.** (2002) *Proc Natl Acad Sci U S A* Regeneration of misprimed nonribosomal peptide synthetases by type II thioesterases. *99*, 14083-8.
39. **Yeh, E., Kohli, R. M., Bruner, S. D., and Walsh, C. T.** (2004) *ChemBiochem* Type II thioesterase restores activity of a NRPS module stalled with an aminoacyl-S-enzyme that cannot be elongated. *5*, 1290-3.
40. **Walsh, C. T., Chen, H., Keating, T. A., Hubbard, B. K., Losey, H. C., Luo, L., Marshall, C. G., Miller, D. A., and Patel, H. M.** (2001) *Curr Opin Chem Biol* Tailoring enzymes that modify nonribosomal peptides during and after chain elongation on NRPS assembly lines. *5*, 525-34.
41. **Walsh, C. T., Freel Meyers, C. L., and Losey, H. C.** (2003) *J Med Chem* Antibiotic glycosyltransferases: antibiotic maturation and prospects for reprogramming. *46*, 3425-36.
42. **Walsh, C. T., Fisher, S. L., Park, I. S., Prahalad, M., and Wu, Z.** (1996) *Chem Biol* Bacterial resistance to vancomycin: five genes and one missing hydrogen bond tell the story. *3*, 21-8.
43. **Zerbe, K., Woithe, K., Li, D. B., Vitali, F., Bigler, L., and Robinson, J. A.** (2004) *Angew Chem Int Ed Engl* An oxidative phenol coupling reaction catalyzed by oxyB, a cytochrome P450 from the vancomycin-producing microorganism. *43*, 6709-13.
44. **Hotchkiss, R. D., and Dubois, R. J.** (1940) *J Biol Chem* Fractionation of bactericidal agent from cultures of a soil bacillus. *132*, 791-792.
45. **Sarges, R., and Witkop, B.** (1965) *J Am Chem Soc* Gramicidin A. V. The structure of valine- and isoleucine-gramicidin A. *87*, 2011-2020.
46. **Weinstein, S., Wallace, B. A., Morrow, J. S., and Veatch, W. R.** (1980) *J Mol Biol* Conformation of the gramicidin A transmembrane channel: A <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance study of <sup>13</sup>C-enriched gramicidin in phosphatidylcholine vesicles. *143*, 1-19.
47. **Wallace, B. A.** (1998) *J Struct Biol* Recent Advances in the High Resolution Structures of Bacterial Channels: Gramicidin A. *121*, 123-41.

48. **Kessler, N.** (2002) *Diplomarbeit* Untersuchungen zur gezielten Veränderung von nichtribosomalen Peptidsynthetasen durch Modulaustausch und zur Charakterisierung von Formyltransferasedomänen. *Philipps-Universität Marburg*.
49. **Cooper, D. G., Macdonald, C. R., Duff, S. J. B., and Kosaric, N.** (1981) *Appl. Environ. Microbiol.* Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. *42*, 408-412.
50. **Stachelhaus, T., Schneider, A., and Marahiel, M. A.** (1996) *Biochem Pharmacol* Engineered biosynthesis of peptide antibiotics. *52*, 177-86.
51. **Mootz, H. D., and Marahiel, M. A.** (1997) *J Bacteriol* The tyrocidine biosynthesis operon of *Bacillus brevis*: complete nucleotide sequence and biochemical characterization of functional internal adenylation domains. *179*, 6843-50.
52. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
53. **Schneider, A., and Marahiel, M. A.** (1998) *Arch Microbiol* Genetic evidence for a role of thioesterase domains, integrated in or associated with peptide synthetases, in non-ribosomal peptide biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *169*, 404-10.
54. **Kohli, R. M., Trauger, J. W., Schwarzer, D., Marahiel, M. A., and Walsh, C. T.** (2001) *Biochemistry* Generality of peptide cyclization catalyzed by isolated thioesterase domains of nonribosomal peptide synthetases. *40*, 7099-108.
55. **Akers, H. A., Lee, S. G., and Lipmann, F.** (1977) *Biochemistry* Identification of two enzymes responsible for the synthesis of the initial portion of linear gramicidin. *16*, 5722-9.
56. **Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. J.** (1997) *Nucleic Acids Res* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *25*, 3389-402.
57. **Schuhmann, H.** (2003) *Diplomarbeit* Konstruktion neuartiger Hybridmodule aus den Lgr - Synthetasen. *Philipps-Universität Marburg*.
58. **Schmitt, E., Blanquet, S., and Mechulam, Y.** (1996) *Embo J* Structure of crystalline *Escherichia coli* methionyl-tRNA(f)Met formyltransferase: comparison with glycylamide ribonucleotide formyltransferase. *15*, 4749-58.
59. **Schwede, T., Kopp, J., Guex, N., and Peitsch, M. C.** (2003) *Nucleic Acids Res* SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. *31*, 3381-5.
60. **Buchenau, B., and Thauer, R. K.** (2004) *Arch Microbiol* Tetrahydrofolate-specific enzymes in *Methanosarcina barkeri* and growth dependence of this methanogenic archaeon on folic acid or p-aminobenzoic acid. *182*, 313-25.
61. **Grunewald, J., Sieber, S. A., and Marahiel, M. A.** (2004) *Biochemistry* Chemo- and regioselective peptide cyclization triggered by the N-terminal fatty acid chain length: the recombinant cyclase of the calcium-dependent antibiotic from *Streptomyces coelicolor*. *43*, 2915-25.
62. **Bure, C., Gobert, W., Lelievre, D., and Delmas, A.** (2001) *J Mass Spectrom* In-source fragmentation of peptide aldehydes and acetals: influence of peptide length and charge state. *36*, 1149-55.
63. **Challis, G. L., Ravel, J., and Townsend, C. A.** (2000) *Chem Biol* Predictive, structure-based model of amino acid recognition by nonribosomal peptide synthetase adenylation domains. *7*, 211-24.

64. **Akashi, K., Kubota, K., and Kurahashi, K.** (1977) *J Biochem (Tokyo)* Biosynthesis of enzyme-bound formylvaline and formylvalylglycine. A possible initiation complex for gramicidin A biosynthesis. *81*, 269-72.
65. **Metz, B., Kersten, G. F., Hoogerhout, P., Brugghe, H. F., Timmermans, H. A., de Jong, A., Meiring, H., ten Hove, J., Hennink, W. E., Crommelin, D. J., and Jiskoot, W.** (2004) *J Biol Chem* Identification of formaldehyde-induced modifications in proteins: reactions with model peptides. *279*, 6235-43.
66. **Stachelhaus, T., Schneider, A., and Marahiel, M. A.** (1995) *Science* Rational design of peptide antibiotics by targeted replacement of bacterial and fungal domains. *269*, 69-72.
67. **Dieckmann, R., Pavela-Vrancic, M., von Dohren, H., and Kleinkauf, H.** (1999) *J Mol Biol* Probing the domain structure and ligand-induced conformational changes by limited proteolysis of tyrocidine synthetase 1. *288*, 129-40.
68. **Doekel, S., and Marahiel, M. A.** (2000) *Chem Biol* Dipeptide formation on engineered hybrid peptide synthetases. *7*, 373-84.
69. **Mootz, H. D., Schwarzer, D., and Marahiel, M. A.** (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* Construction of hybrid peptide synthetases by module and domain fusions. *97*, 5848-53.
70. **Mootz, H. D., Kessler, N., Linne, U., Eppelmann, K., Schwarzer, D., and Marahiel, M. A.** (2002) *J Am Chem Soc* Decreasing the ring size of a cyclic nonribosomal peptide antibiotic by in-frame module deletion in the biosynthetic genes. *124*, 10980-1.
71. **Fabret, C., Ehrlich, S. D., and Noirot, P.** (2002) *Mol Microbiol* A new mutation delivery system for genome-scale approaches in *Bacillus subtilis*. *46*, 25-36.
72. **Brans, A., Filee, P., Chevigne, A., Claessens, A., and Joris, B.** (2004) *Appl Environ Microbiol* New integrative method to generate *Bacillus subtilis* recombinant strains free of selection markers. *70*, 7241-50.
73. **Weber, T., Baumgartner, R., Renner, C., Marahiel, M. A., and Holak, T. A.** (2000) *Structure Fold Des* Solution structure of PCP, a prototype for the peptidyl carrier domains of modular peptide synthetases. *8*, 407-18.
74. **Duerfahrt, T., Doekel, S., Sonke, T., Quaedflieg, P. J., and Marahiel, M. A.** (2003) *Eur J Biochem* Construction of hybrid peptide synthetases for the production of alpha-l-aspartyl-l-phenylalanine, a precursor for the high-intensity sweetener aspartame. *270*, 4555-63.

## 10 Anhang

### 10.1 Konservierte Bereiche bei NRPS (*core motifs*)

Domäne	Motiv	Sequenz	Domäne	Motiv	Sequenz
A-Domäne	A1	L(TS)YxEL	E-Domäne	E1	PIQxWF
	A2	LKAGxAYL(VL)P(LI)D		E2	HHxISDG(WV)S
	A3	LAYxxYTSG(ST)TGxPKG		E3	DxLLxAxG
	A4	FDxS		E4	EGHGRE
	A5	NxYGPTE		E5	RTVGWFTxxYP(YV)PF
	A6	GELxIxGxG(VL)ARGYL		E6	PxxGxGYG
	A7	Y(RK)TGDL		E7	GNYLG(QR)
	A8	GRxDxQVKIRGxRIELGEIE	Cy-Domäne	Z1	FPL(TS)xxYxAYxxGR
	A9	LPxYM(IV)P		Z2	RHx(IM)L(PAL)x(ND)GxQ
	A10	NGK(VL)DR		C3'	(DNR)xxxxDxxS
PCP	T	DxFFxxLGG(HD)S(LI)	Z3	(LI)Pxx(PAL)x(LPF)P	
C-Domäne	C1	SxAQxR(LM)(WY)xL	Z4	(TS)(PA)xxx(LAF)6x(IVT)LxxW	
	C2	RHExLRTxF	Z5	(GA)(DQN)FT	
	C3	MHHxISDG(WV)S	Z6	P(IV)VF(TA)SxL	
	C4	YxD(FY)AVW	Z7	QVx(LI)Dx(QH)11xW(DYF)	
	C5	(IV)GxFVNT(QL)xR	R-Domäne	R1	V(LF)(LV)TG(AV)(TN)G(YF)LG
	C6	(HN)QD(YV)PFE		R2	VxxxVRA
	C7	RDxSRNPL		R3	GDL
M-Domäne	M1	VL(DE)GxGxG		R4	VYPYxxLRx(PL)NVxxT
	M2	NELsYRYxAV		R5	GYxxSKWxxE
	M3	VEsSxARQxGxLD		R6	RPG
Ox-Domäne	Ox1	KYxYxSxGxxY(PG)VG		R7	LExx(VI)GFLxxP
	Ox2	GxxxG(LV)xxGxYYY(HD)P	TE-Domäne	Te	G(HY)SxG

## 10.2 Verwendete Oligonukleotide

SP – Sequenzierprimer; KP – Klonierungsprimer; KoP – Kontrollprimer.

Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen sind unterstrichen und kursiv hervorgehoben.

Name	Sequenz 5'-.....-3'	Beschreibung
NK 29	TCA ATT TCT CGG TTT CCT GAC G	SP NRPS-Fragment
NK 30	GCA TTT GCA ACA TTT GTT GGC G	SP NRPS-Fragment
NK 31	GAA AAT GCT CTC GAA CAG CGG	SP NRPS-Fragment
NK 32	AAA ACG GTG CAC CAG TTG TTT G	SP NRPS-Fragment
NK 33	TTT GCG GAA ACG GCA GCC	SP NRPS-Fragment
NK 34	CGA AGA AAG ACA GCA TCT GC	SP NRPS-Fragment
NK 35	ACC TGT ACG GCT TGT CCG	SP NRPS-Fragment
NK 36	CAA AAG GGG TTC TCG CCG	SP NRPS-Fragment
NK 37	CAC ATA AGC AGA AGG CAC C	SP NRPS-Fragment
NK 42	GCT TCT CCG TCT CTT CCC	SP NRPS-Fragment
NK 45	CGA CGG CCA GTG AAT TCG AGC	KP <i>upp-phleo</i>
NK 47	CCT GCG CAA GAC GAA CAA GTG	KoP <i>upp</i> -Gen im Genom
NK 48	GCT TGC CAT GCC AGC ATC GGC	KoP <i>upp</i> -Gen im Genom
NK 51	ATA <u>AGA TCT</u> AAT CAA AAA ACA GAT GGC C	KP P <sub>srf</sub>
NK 56	ATA <u>AGA TCT</u> AGC TTG CAT GCC TGC AGG TCG	KP <i>upp-phleo</i>
NK 57	ATA <u>CCC GGG</u> GCA ATA AAA AAA GAT TGA ACG	KP P <sub>srf</sub>
NK 64	TGC TGC AAG GCG ATT AAG TTG G	SP pCC1FOS
NK 65	GTA TGT TGT GTG GAA TTG TGA GC	SP pCC1FOS

---

NK 71	CAC CGT GAG AAT ACT ATT CCT AAC AAC	KP <i>IgrA</i> 5' (FAT)
NK 73	CAA ATC GCT AAT CAA GTC CAT A	KP <i>IgrA</i> 3' (ATE)
NK 74	CAC CAA AAG GTT TGA ACT GGT AAC GG	KP <i>IgrA2ATE</i> 5' (ATE)
NK 76	CAC CCA AAC GCC AGT GGA AAT CAT G	KP <i>IgrD4TR</i> 5' (PCP-R)
NK 77	CAC CGA AAT TAT CAA ACA CGG TTT GAC	KP <i>IgrD4R</i> 5' (R)
NK 78	GTT CCG TGT ATT TTG TGT CAC	KP <i>IgrD</i> 3' (PCP-R; R)
NK 84	TTG CTC CGT AAG CAG ACG	KP <i>IgrA1</i> 3' (FAT)
NK 113	TAT <u>CCC GGG</u> TCA TGT TTG ACA GCT TAT CAT C	KP <i>C' srfAA3</i> 3'
NK 114	TAT <u>CCC GGG</u> CCT GCC ACC ATA CCC ACG	KP <i>cat</i> 5'
NK 115	CGA AAT AGG CTA TCT CGC AC	SP <i>srfA3C</i> 3'
NK 116	TAT <u>AGA TCT</u> TCA TGT TTG ACA GCT TAT CAT C	KP <i>cat</i> 3'
NK 125	CAC CAT GAT TAC AGG AAA AGC GAC AC	KP <i>IgrE_short</i> 5'
NK 126	CAC CAT GGA GAA AGC ACA CCA GTG	KP <i>IgrE_long</i> 5'
NK 127	CCT CGC GCC AAT GAC GG	KP <i>IgrE</i> 3'
NK 132	TAT CCA TGG AAA TTA TCA AAC ACG G	KP <i>IgrD4R</i> 5' pNKH1
NK 133	ATA AAG CTT GTT CCG TGT ATT TTG TGT CAC	KP <i>IgrD4</i> 3' pNKH1

---

## Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Marahiel für die Möglichkeit, an diesen beiden Projekten arbeiten zu können. Dabei hatte ich methodisch fast immer freie Hand, so daß ich auch viel neues ausprobieren und „über den Tellerrand“ schauen konnte. Die Finanzierung für Topo-Kits war gottseidank nie ein Thema, ebenso wenig wie ständig neue Sequenzierungen oder andere nützliche Gerätschaften. Die Arbeitsbedingungen waren dadurch hervorragend. Danke sage ich ihm auch für die ideelle und finanzielle Unterstützung meiner Projekte für das Schülermentoring-Projekt.

Prof. Bölker danke ich für die Betreuung vom FB Biologie aus und die Übernahme des Erstgutachtens. Ebenso danke ich ihm dafür, daß er sich spontan Zeit nimmt bei Fragen und Problemen.

Prof. Dr. Kahmann danke ich für die gute Betreuung als Mentorin während der letzten drei Jahre und die hilfreichen Kommentare und Tipps während der gesamten Zeit.

All meinen lieben Laborkollegen aus 4707 danke ich für die oft lustige gemeinsame Zeit, vor allem dem „diebischen Volk“ Christoph Mahlert und Jan Grünewald, die auch immer wieder für die vielen chemischen Fragen herhalten mußten und die mir bei der Festphasenpeptidsynthese samt Aufbereitung behilflich waren.

Für viele schöne Stunden und zahllose Diskussionen und Ideen oft auch außerhalb des Labors danke ich Karen Hunger, Martina Pfeiff, Jenny Hilberg, Dr. Carsten Beckering, Dr. Uwe Linne und Holger Schuhmann. So macht Forschen Spaß! Auch dem Rest der Arbeitskreise Marahiel, Essen und Stachelhaus sowie all meinen Vertieferstudenten und Praktikanten sei für die schöne Zeit und stete Hilfsbereitschaft gedankt.

Antje Schäfer gebührt ein Riesendank. Ihr Organisationstalent und die immerwährende Hilfsbereitschaft auch nach offiziellem Feierabend haben zum Erfolg der unzählbaren 5L-Expressionen und der Lösung diverser Probleme beigetragen.

Meiner Auszubildenden zur Chemielaborantin, Sabrina Morneweg, danke ich für die tolle Zusammenarbeit, durch die wir meistens einen 14-Stunden-Tag bewältigen konnten und die meine Arbeit gut vorankommen lies.

Christian Renner sei gedankt für seine wochenlangen Bemühungen, mit mir zusammen das Aldehyd-Substrat auf chemischem Wege zu synthetisieren. Auch wenn es nicht geklappt hat, hat er mir doch einiges an Chemie vermitteln können.

Dr. Carsten Beckering und Dr. Uwe Linne danke ich für die kritische Durchsicht der Arbeit sowie ihre hilfreichen Kommentare. Auch danke ich Uwe für die exzellente Unterstützung bei den LCMS-Messungen, die für diese Arbeit essentiell waren.

Der Studienstiftung des deutschen Volkes sowie dem Graduiertenkolleg „Proteinfunktion auf atomarer Ebene“ danke ich für die finanzielle Unterstützung durch Doktorandenstipendien.

Last but not least, der größte Dank gebührt meiner Familie.

Ohne meinen Mann Guido hätte ich wohl zwischenzeitlich mehr als einen Nervenzusammenbruch erlitten. Seine immerwährende liebevolle Unterstützung vor allem in den Zeiten, wo die Forschung nicht so wie ich wollte, hat mich stets wieder aufgebaut und neu motiviert.

Auch danke ich meinen Eltern und Oma Ursel, die mich immer unterstützten, sowohl während des Studiums als auch während der Doktorarbeit.

## Erklärung

Ich versichere, daß ich meine Dissertation

**Die molekulare Logik der nichtribosomalen Peptidsynthetasen: Identifizierung und biochemische Charakterisierung der Biosynthesegene für Gramacidin A**

selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

---

(Ort/Datum)

---

(Unterschrift mit Vor- und Zuname)

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Nadine Schracke geb. Keßler  
Geburtstag: 25. Dezember 1977  
Geburtsort: Limburg a. d. Lahn

### Schulausbildung

1983 – 1988 Grundschule Villmar  
1988 – 1997 Gymnasium Marienschule Limburg  
Juni 1997 Abitur

### Studium

Oktober 1997-  
Februar 2002 Studium der Biologie an der Philipps-Universität Marburg  
Schwerpunkte Biochemie, Genetik und Mikrobiologie  
Februar 2002 Diplom Biologie  
Diplomarbeit am Fachbereich Chemie in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M. Marrahiel: Untersuchungen zur gezielten Veränderung von nichtribosomalen Peptidsynthetasen durch Modulaustausch und zur Charakterisierung von Formyltransferasedomänen.

### Promotion

März 2002-  
März 2005 Promotion am Fachbereich Biologie. Anfertigung der Arbeit am Fachbereich Chemie, Betreuung durch Prof. Dr. M. Marrahiel.