

Untersuchung der Initiation der Surfactin-Biosynthese in *Bacillus subtilis* OKB 105

vorgelegt von
Diplom-Biochemikerin
Andrea Sokoll

Vom Fachbereich 5 - Chemie -
Der Technischen Universität Berlin

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat.-

genehmigte Dissertation

Berlin 1999
D 83

Untersuchung der Initiation der Surfactin-Biosynthese in *Bacillus subtilis* OKB 105

vorgelegt von
Diplom-Biochemikerin
Andrea Sokoll

Vom Fachbereich 5 - Chemie -
Der Technischen Universität Berlin

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat.-

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuß

Vorsitzender: Prof. Dr. W. Lubitz
Berichter: Priv. Doz. J. Vater
Berichter: Prof. Dr. J. Salnikow

Tag der mündlichen Prüfung: 21. Dezember 1999

Berlin 1999
D 83

Zusammenfassung

Sokoll, Andrea

Untersuchung der Initiation der Surfactin-Biosynthese in *Bacillus subtilis* OKB 105

Die Biosynthese des zyklischen Lipopeptids Surfactin in *Bacillus subtilis* OKB 105, das aus sieben Aminosäuren und einer β -Hydroxy-Fettsäure besteht, wird durch die drei Enzyme SrfA, SrfB und SrfC katalysiert. Die Synthese erfolgt nicht-ribosomal nach dem Multiple-Carrier-Modell, indem die Substrataminosäuren in einem zweistufigen Prozeß aktiviert werden.

Versuche mit den aufgereinigten Surfactin-Synthetase-Teilenzymen zeigten, daß die Synthese von Surfactin ausschließlich mit diesen drei Enzymen möglich ist und die früher postulierte Acyltransferase E3 für die Initiation nicht benötigt wird. Die Initiation der *in vitro*-Surfactin-Biosynthese wurde insbesondere an dem gentechnisch hergestellten Glutaminsäure-aktivierenden Modul und entsprechenden Mutanten getestet. Es sollte auf diese Weise ausgeschlossen werden, daß an den aufgereinigten Surfactin-Synthetase-Teilenzymen eine Acyltransferase assoziiert vorlag, die in der Lage ist, die *in vitro*-Surfactin-Biosynthese zu katalysieren. Es konnte auf diese Weise die Bildung der linearen und laktonisierten Initiationsprodukte β -HA-CoA-[14 C]Glu gezeigt werden. Durch die Zugabe von E3 wurde die Bildung der enzymgebundenen Initiationsprodukte gehemmt.

Für Funktionsstudien wurde SrfD heterolog in *Escherichia coli* als Fusionsprotein mit dem Maltose-bindenden Protein exprimiert und durch Affinitätschromatographie gereinigt. Es wurde zur Herstellung des anti-MBP-SrfD-Antikörpers verwendet, mit dessen Hilfe erstmals in den E3-Fractionen SrfD immunchemisch nachgewiesen wurde. Die Funktion von SrfD ist noch nicht aufgeklärt. Es wird jedoch vermutet, daß es an der Zyklisierung von Surfactin beteiligt ist. Dies könnte die beobachtete Stimulierung der *in vitro*-Surfactin-Biosynthese durch E3-Fractionen erklären.

Die Nukleotidsequenz des 40 kDa Proteins aus der E3-Fraktion von *B. subtilis* OKB 105 wurde ermittelt und durch einen Sequenzvergleich als das Gen *yurP* identifiziert. Das daraus resultierende Protein zeigt Homologien zu dem Protein MocD aus *Agrobacterium tumefaciens*, das am Katabolismus von Mannopin beteiligt ist. MocD katalysiert wahrscheinlich die Spaltung des Zwischenproduktes Santhopin in Glutamin und Mannose.

YurP wurde für Funktionsstudien heterolog in *Escherichia coli* exprimiert und dabei zur Aufreinigung durch Affinitätschromatographie mit sechs Histidinresten markiert. N-His₆-YurP zeigt jedoch keinen Einfluß auf die *in vitro*-Surfactin-Biosynthese.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Sekundärmetabolite	1
1.2	Das Multiple Carrier Model	3
1.3	Modulare Struktur von Peptid-Synthetasen.....	5
1.4	Phosphopantetheinyl-Transferasen	7
1.5	Thioesterasen	8
1.6	Surfactin	9
1.7	Biosynthese von Surfactin.....	10
1.8	Acyltransferasen	12
2	Problemstellung	12
3	Materialien und Methoden	14
3.1	Materialien.....	14
3.1.1	Feinchemikalien und Lösungsmittel	14
3.1.2	Radiochemikalien.....	15
3.1.3	Enzyme und Kits.....	15
3.1.4	Säulenmaterial.....	15
3.1.5	Geräte	15
3.1.6	Membranen.....	16
3.1.7	Bakterienstämme und Plasmide.....	16
3.2	Methoden.....	16
3.2.1	Synthese von 3-Hydroxytetradecanoyl-Coenzym A.....	16
3.2.2	Zellanzucht	17
3.2.2.1	Anzucht von <i>Bacillus subtilis</i> OKB 105	17
3.2.2.2	Anzucht von <i>Escherichia coli</i> DH5 α	17
3.2.3	Herstellung eines zellfreien Rohextraktes aus <i>Bacillus subtilis</i> OKB 105 ...	18
3.2.3.1	Zellaufschluß	18
3.2.3.2	Nukleinsäurefällung	18
3.2.3.3	Ammoniumsulfatfällung.....	18
3.2.3.4	Gelpermeationschromatographie an Ultrogel AcA34.....	19
3.2.3.5	Anionenaustauscher-FPLC an Pharmacia MonoQ	19
3.2.4	Bestimmung enzymatischer Aktivitäten	19
3.2.4.1	Aminoacyladenylierung der Substrataminosäuren	19
3.2.4.2	Thioesterbeladung.....	20
3.2.4.3	<i>In vitro</i> -Surfactin-Biosynthese.....	20
3.2.4.4	Initiation der <i>in vitro</i> -Surfactin-Biosynthese.....	21

3.2.5	Nachweis von Surfactin.....	21
3.2.5.1	Dünnschichtchromatographie von Surfactin und Initiationsprodukten	21
3.2.5.2	Massenspektrometrische Untersuchung von Surfactin	21
3.2.6	Proteinbestimmung	22
3.2.7	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	22
3.2.8	Westernblot-Analyse.....	23
3.2.8.1	Semidry-Blotting.....	23
3.2.8.2	Immunoblotanalyse des SrfD-Proteins.....	23
3.2.9	Genetische Methoden.....	24
3.2.9.1	Präparation chromosomaler DNA aus <i>Bacillus subtilis</i>	24
3.2.9.2	Minipräparation von Plasmid-DNA.....	24
3.2.9.3	Präparative Plasmidisolierung	25
3.2.9.4	Polymerasekettenreaktion.....	25
3.2.9.5	Inverse Polymerasekettenreaktion	26
3.2.9.6	Restriktionsverdau von DNA	27
3.2.9.7	Agarosegelelektrophorese	27
3.2.9.8	Isolierung von DNA aus Agarosegelen.....	28
3.2.9.9	Ligation.....	28
3.2.9.10	Herstellung kompetenter Bakterien.....	28
3.2.9.11	Transformation von Plasmid-DNA in <i>E. coli</i>	29
3.2.9.12	DNA-Sequenzierung	29
3.2.10	Expression rekombinanter Proteine	30
3.2.10.1	Affinitätschromatographie von N-His ₆ -YurP an einer Nickelchelat-Matrix. 30	
3.2.10.2	Affinitätschromatographie von MBP-SrfD an einer Amylose-Matrix	31
4	Ergebnisse.....	32
4.1	Bestimmung der Nukleotidsequenz des 40 kDa Proteins	32
4.1.1	Bestimmung der 5'- und 3'-Enden der Nukleotidsequenz des 40 kDa Proteins.....	34
4.2	Heterologe Expression von <i>srfD</i> und <i>yurP</i>	36
4.2.1	Herstellung des MBP-SrfD-Plasmids	37
4.2.2	Überexpression des MBP-SrfD-Fusionsproteins.....	37
4.2.3	Herstellung des N-His ₆ -YurP-Plasmids	38
4.2.3.1	Überexpression von N-His ₆ -YurP.....	38
4.3	Detektion der Surfactin-Synthetase-Teilenzyme	39
4.4	Identifizierung von SrfD in den E3-Fractionen mit dem MBP-SrfD-Antikörper	42
4.5	Kinetik der <i>in vitro</i> -Surfactin-Biosynthese	45
4.5.1	Untersuchung des Einflusses von MBP-SrfD-Fusionsprotein, N-His ₆ -YurP und E3 auf die <i>in vitro</i> -Surfactin-Biosynthese	51
4.6	Untersuchung der Initiation der <i>in vitro</i> -Surfactin-Biosynthese.....	53

4.6.1	Expression des C-His ₆ -markierten Glutaminsäure-aktivierenden Moduls und der entsprechenden Mutanten.....	53
4.6.2	Funktionsuntersuchungen des Glutaminsäure-aktivierenden Moduls Glu-6-His und der Mutanten Glu-A1 ₃₉ A1 ₄₀ -6-His und Glu-Δ-6-His	55
4.6.2.1	Thioesternbau und Glutaminsäure-abhängiger ATP/PP _i -Austausch	55
4.6.3	Initiation der <i>in vitro</i> -Lipopeptidsynthese	57
4.6.4	Untersuchung der Initiation der <i>in vitro</i> -Surfactin-Biosynthese in Abhängigkeit der E3-Fraktion	58
5	Diskussion.....	60
5.1	Surfactin-Biosynthese	60
5.2	Initiation der <i>in vitro</i> -Surfactin-Biosynthese	61
5.3	Studien zur Identifizierung von E3	66
5.3.1	Identifizierung des 40 kDa Proteins aus der E3-Fraktion	66
5.3.2	Immunochemische Identifizierung von SrfD aus der E3-Fraktion.....	68
5.4	Ausblick.....	69
6	Literaturverzeichnis.....	71

Abkürzungsverzeichnis

AcA	Acrylamid cum Agarose
ACP	Acyl-Carrier-Protein
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
Ci	Curie
CoA	Coenzym A
cpm	counts per minute
ddNTP	2',3'-Di-Desoxynukleosidtriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DTE	1,4-Dithioerythritol
DNTB	3,3'-Dithiobis(6-nitrobenzoesäure)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
β -HA-CoA	3-Hydroxytetradecanoyl-S-Coenzym A
His	Histidin
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
MALDI-MS	Matrix-unterstützte Laser-Desorptions-Ionisations Massen-Spektrometrie
min	Minute
ml	Milliliter
μ l	Mikroliter
NBRF	National Biomedical Research Foundation
NCBI	National Center of Biological Information
NI-NTA	Nickel-nitrilo-triacetic acid
NTP	Nukleosidtriphosphat
ORF	open reading frame, offener Leserahmen
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PKS	Polyketidsynthase
PMSF	Phenylmethylsulphonylfluorid
PPi	Pyrophosphat
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
Tab	Tabelle
TAE	Tris/Acetat/EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TNB	3-Thio(6-nitrobenzoesäure)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute
v	Volumen
v/v	Volumen/Volumen
w	Gewicht
w/v	Gewicht/Volumen

1 Einleitung

1.1 Sekundärmetabolite

Mikroorganismen produzieren eine Vielzahl von Sekundärmetaboliten, z.B. Pigmente, Geruchsstoffe, Alkaloide und Antibiotika. Ein Teil dieser Produkte wird industriell genutzt, wobei das bekannteste das Antibiotikum Penicillin ist (Fleming 1929). Die Funktion dieser Sekundärmetabolite und ihre Bedeutung für die Mikroorganismen ist zum Teil noch unbekannt (Katz und Demain 1977, Vining 1990, Zuber *et al.* 1993). Peptide und Lipopeptide stellen eine Klasse von Sekundärmetaboliten dar, deren industrielle Anwendungsvielfalt Antibiotika, Immunmodulatoren und Biotenside umfaßt (Vater 1986). Die Bildung dieser Sekundärmetabolite kann in eine ribosomale und nicht-ribosomale Synthese unterteilt werden. Bei der ribosomalen Synthese, wie z.B. beim Antibiotikum Subtilin, werden die Polypeptide als Precursoren synthetisiert und posttranslational modifiziert. Bei der nicht-ribosomalen Synthese werden die Peptide und Lipopeptide an großen multifunktionellen Enzymkomplexen gebildet, die molekulare Zellfabriken darstellen. Die Strukturmerkmale nicht-ribosomal hergestellter Peptide und Lipopeptide sind vielfältig und reichen von linearen, zyklischen bis zu verzweigt zyklischen Strukturen. Ihre chemische Zusammensetzung ist nicht auf die zwanzig proteinogenen Aminosäuren beschränkt, sondern es werden seltene Aminosäuren und andere Bestandteile, wie z.B. Ornithin, Citrullin, γ -Aminobuttersäure, α -Aminosäuren in D-Konfiguration, N-methylierte Aminosäuren, Hydroxysäuren und Chromophore, zur Synthese verwendet (Kleinkauf und von Döhren 1990 und 1996, Zuber *et al.* 1993). Das kleinste bekannte, natürlich vorkommende Peptid ist das Dipeptid Bacilysin (Walker und Abrahams 1970). Das größte bisher bekannte nicht-ribosomal synthetisierte Peptid ist das Alamethicin aus zwanzig Aminosäure-komponenten (Kleinkauf und von Döhren 1990).

Multienzyme zur Synthese von nicht-ribosomal gebildeten Peptiden und Lipopeptiden wurden z. B. in einigen *Bacilli*-Stämmen identifiziert. In Abbildung 1-1 sind einige dieser Naturstoffe dargestellt, die von *B. subtilis* und *B. brevis* synthetisiert werden.

Surfactin A	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{10-12}-\underset{\begin{array}{c} \\ \text{O} \end{array}}{\text{CH}}-\text{CH}_2-\text{L-Glu-L-Leu-D-Leu-L-Val-L-Asp-D-Leu-L-Leu}$
Surfactin B	L-Val
Surfactin C	L-Ile
Iturin A	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{11-13}-\underset{\begin{array}{c} \\ \text{NH} \end{array}}{\text{CH}}-\text{CH}_2-\text{CO-L-Asn-D-Tyr-D-Asn-L-Gln-L-Pro-D-Asn-L-Ser}$
Iturin C	L-Asp
Fengycin	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{13-16}-\underset{\begin{array}{c} \\ \text{OH} \end{array}}{\text{CH}}-\text{CH}_2-\text{CO-L-Glu-D-Orn-L-Tyr-D-allo-Thr-L-Glu-D-Ala}$ $\text{L-Ile-D-Tyr-L-Gln-L-Pro}$
Gramicidin S	$\text{D-Phe-L-Pro-L-Val-L-Orn-L-Leu}$ $\text{L-Leu-L-Orn-L-Val-L-Pro-D-Phe}$

Abbildung 1-1: **Peptide und Lipopeptide aus *Bacillus subtilis* und *Bacillus brevis***

Surfactine und Iturine sind zyklische Lipoheptapeptide, in die eine β -Hydroxy- bzw. β -Amino-Fettsäure integriert ist. Die Zyklisierung von Surfactin erfolgt über eine Laktonisierung. Iturin zyklisiert über eine Peptidbindung zwischen der Carboxylgruppe des Serinrests und der Aminogruppe der Fettsäure. Fengycin ist ein Lipodecapeptid, das eine β -Hydroxy-Fettsäure in seiner Seitenkette enthält. Gramicidin S ist ein zyklisches Decapeptid, das aus zwei identischen Pentapeptiden besteht, die in einer Kopf-Schwanz Kondensation zyklisieren. Diese Peptide und Lipopeptide kommen in der Natur als Gemische von Strukturisomeren vor, die in ihrer Aminosäurezusammensetzung bzw. in ihrer Fettsäurekomponente variieren. Aus der Vielfalt der Strukturbausteine dieser Verbindungen ergeben sich zahlreiche Anwendungsmöglichkeiten. Beispiele sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1 Wirkungen einiger Peptide und Lipopeptide

Peptid	Wirkung	Referenzen
Surfactin	Biotensid	Arima <i>et al.</i> 1968,
Cyclosporin A	Immunmodulator	Schreiber und Crabtree, 1992, Karpas <i>et al.</i> 1992, Kunz und Hall, 1993
Surfactin, Cyclosporin A, Viscosin	antiviral	Dittmann <i>et al.</i> 1994, Hiramoto <i>et al.</i> 1970, Naruse <i>et al.</i> 1990, Itokawa <i>et al.</i> 1994, Vollenbroich <i>et al.</i> 1997
Surfactin	antitumoral	Kameda <i>et al.</i> 1972, 1974
Surfactin	antimykoplasmatisch	Vollenbroich <i>et al.</i> 1996, Nissen <i>et al.</i> 1997
Iturin, Mycosubtilin, Bacillomycin	fungizid	Besson <i>et al.</i> 1976, 1984, 1989, Genest <i>et al.</i> 1987
Esperin, Surfactin	antimikrobiell	Bernheimer und Avigad, 1970, Thomas und Ito, 1969, Imai <i>et al.</i> 1971
Plipastatin	Enzyminhibitor	Nishikiori <i>et al.</i> 1986, Umezawa <i>et al.</i> 1986

1.2 Das Multiple Carrier Modell

Die nicht-ribosomale Synthese mikrobieller Peptidantibiotika erfolgt nach dem von F. Lipmann postulierten polyenzymatischen Syntheseweg (F. Lipmann, 1954). In den Sechzigerjahren wurden die ersten Untersuchungen der Biosynthesen von Gramacidin S und Tyrocidin durchgeführt. Es wurde versucht, die Synthese dieser Substanzen mit Chloramphenicol und Puromycin, bekannten Inhibitoren der ribosomalen Protein-Biosynthese, zu hemmen (Mach *et al.* 1963, Eikhom *et al.* 1963). Man stellte fest, daß sich die Synthese dieser mikrobiellen Peptide nicht durch diese beiden Inhibitoren beeinflussen ließ, und schloß daraus, daß es einen Syntheseweg für diese Peptidantibiotika geben mußte, der unabhängig von Ribosomen ist. Das Prinzip der nicht-ribosomalen Peptidsynthese wurde dann in den Siebzigerjahren in den Arbeitsgruppen von Lipmann, Laland und Kurahashi erforscht (Lipmann 1973, Laland und Zimmer 1973, Kurahashi 1974). Es wurde im Rahmen dieser Arbeiten ein Thiotemplate-Modell vorgeschlagen. Nach diesem Modell aktivieren Peptid-Synthetasen,

die große Multienzymkomplexe darstellen, ihre Substrataminosäuren in einem zweistufigen Prozeß. Im ersten Schritt werden ATP-abhängig nicht kovalent gebundene Aminoacyl-Adenylate gebildet. Bei dieser Reaktion wird durch die Spaltung der energiereichen α,β -Phosphatbindung Pyrophosphat freigesetzt. Diese Reaktion ist reversibel, d. h. durch die Zugabe von Pyrophosphat kann ATP rückgebildet werden. Im zweiten Schritt werden die adenylierten Aminosäuren auf je eine spezifische reaktive Thiolgruppe am Enzym (Thiotemplate) übertragen. In der ursprünglichen Version des Thiotemplate-Modells wurde an jedem Reaktionszentrum ein Cysteinrest als Bindungsstelle für die jeweilige Substrataminosäure postuliert. Es wurde ferner angenommen, daß die entstehenden Aminoacyl-Thioester in Transthiolierungsreaktionen von einem zentralen mobilen 4'-Phosphopantethein (PPan)-Kofaktor übernommen und zum nächsten Thiotemplate transportiert werden. Dort wird durch eine Transpeptidierungsreaktion das Peptid um eine Aminosäure verlängert und durch eine Transthiolierungsreaktion erneut auf den mobilen 4'-PPan-Kofaktor übertragen. Durch weitere Transthiolierungs- und Transpeptidierungsreaktionen wird die wachsende Peptidkette fertiggestellt.

Durch Markierungen der Thioesterbindungsstellen der Valin- und Leucin-Domäne der Gramicidin S Synthetase 2 mit ^{14}C -Val bzw. Leu und Vergleiche mit den Sequenzen der isolierten Reaktionszentren von Polyketid-, Fettsäure- und Peptid-Synthetasen konnten Schlumbohm *et al.* zeigen, daß anstelle eines Cysteinrestes an jedem Reaktionszentrum ein 4'-PPan-Kofaktor beteiligt ist (Schlumbohm *et al.* 1991). Dieser liegt an einem Serinrest eines hochkonservierten Motivs [LGG(H/D)S(L/I)] gebunden vor (Schlumbohm *et al.* 1991, Stein *et al.* 1994, 1995, 1996). Diese Untersuchungen führten zur Entwicklung des Multiple Carrier Modells der nicht-ribosomalen Peptid-Biosynthese. Nach diesem Modell interagieren die 4'-PPan-Kofaktoren miteinander. Hierbei erfolgt die Verknüpfung der Peptidkette in einer Serie von Transpeptidierungsreaktionen. Die im ursprünglichen Modell postulierten Transthiolierungsreaktionen entfallen.

Es wurde an der Gramicidin S Synthetase gezeigt, daß das Tripeptidintermediat Phenylalanyl-Prolyl-Valin am 4'-PPan-Kofaktor des Valin-aktivierenden Moduls der Gramicidin S Synthetase 2 gebunden vorliegt, wie es das Multiple Carrier Modell voraussagt (Leenders *et al.* 1998).

1.3 Modulare Struktur von Peptid-Synthetasen

Die Aufklärung der Struktur von Peptid-Synthetasen erfolgte bisher im wesentlichen durch die Sequenzierung ihrer Gene und Homologievergleiche. Anhand der erhaltenen Daten wurde gezeigt, daß Peptid-Synthetasen einen modularen Aufbau aufweisen (McCabe *et al.* 1991, Marahiel, 1992, Zuber *et al.* 1993, Stein und Vater, 1996, Marahiel *et al.* 1997). Jedes Modul kann als ein eigenständiges Enzym betrachtet werden, das eine spezifische Substrataminosäure aktiviert. Diese Funktionseinheiten umfassen zwischen 1000-1500 Aminosäuren. Dies entspricht Molekulargewichten von 120-180 kDa. Aminosäure-aktivierende Module zeigen eine lineare Anordnung von konservierten Sequenzmotiven, welche die reaktiven Strukturen für die katalytischen Prozesse darstellen. Sie können in drei Bereiche unterteilt werden und zwar in eine Adenylierungs-, Thiolierungs- und eine Elongationsdomäne (s. Abb. 1-2).

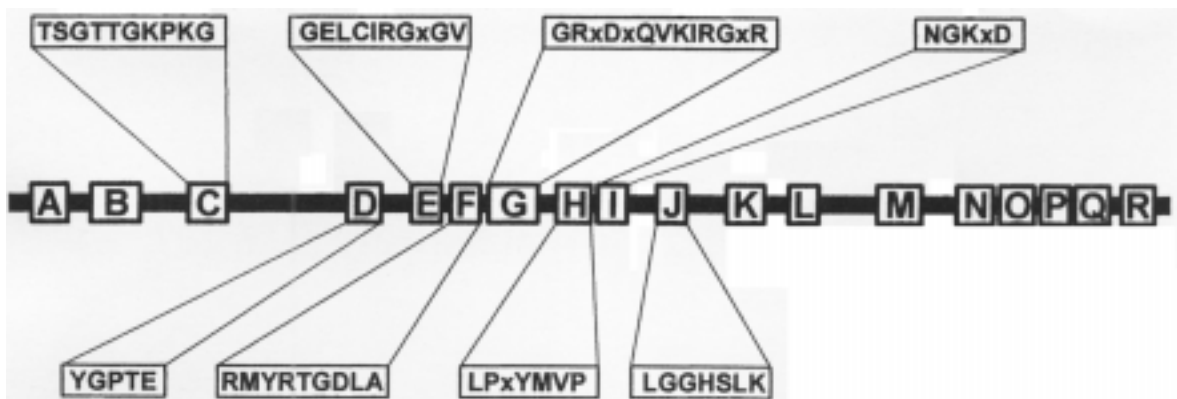


Abbildung 1-2: Schematische Darstellung eines Aminosäure-aktivierenden Moduls von Peptid-Synthetasen.

(Entnommen und modifiziert aus Stein und Vater, 1996). Die zentrale Linie stellt die Proteinkette eines Peptid-Synthetase-Moduls dar. Konservierte Sequenzmotive sind durch Boxen dargestellt und mit großen Buchstaben bezeichnet. Die Sequenzmotive sind für die Motive C-J im Einbuchstabenkode, ober- bzw. unterhalb der Proteinkette, dargestellt. Die Motive A-I sind an den Reaktionen in der Adenylierungsdomäne beteiligt. Das Motiv J der Thiolierungsdomäne trägt an seinem zentralen Serinrest den 4'-PPan-Kofaktor. Die Motive der Elongationsdomäne K-R unterscheiden sich in ihren Sequenzen, je nachdem ob eine Elongations- oder Epimerisierungsdomäne (E) vorliegt. **K**: YPVSSAQKRM_Y; **K(E)**: GExLTPIQxWFF; **L**: LxxRHEALRTxF; **L(E)**: LxxHHDALRMxY; **M**: HHIIxDGxSxxIL; **M(E)**: HHLVVDGVSxWxIL; **N**: TLYxVLxxxYVL; **N(E)**: ExNDILLTAxGLAL; **O**: DIIVGTPxAGExxP; **O(E)**: LEGHGREII; **P**: VGMFVNTLxLR; **P(E)**: SRTVGVWFTSMTP; **Q**: VKxxLxAFxx, **Q(E)**: VPxKGVGYGILxY; **R**: SRHPLLFxxxF; **R(E)**: PxxFNYLGQF

Adenylierungsdomäne: Diese Domäne gehört zur Klasse der Carboxyl-Adenylat-Ligasen. Sie umfasst ca. 500-600 Aminosäurereste und beinhaltet neun konservierte Motive (A-I). Die Bedeutung der Motive A und B ist noch nicht geklärt. Die Motive C, E, F und G sind an der Bindung und Hydrolyse von ATP beteiligt (Turgay *et al.* 1992, Gocht und Marahiel 1994, Pavela-Vrancic *et al.* 1994 a-c).

Thiolierungsdomäne: Diese umfaßt ca. 80-100 Aminosäurereste. Von besonderer Bedeutung ist das hochkonservierte Serin des Motivs J, das die Bindungsstelle für den 4⁻-PPan-Kofaktor und damit für die Substrataminosäure darstellt (Stein *et al.* 1996 Stachelhaus *et al.* 1996.).

Elongationsdomäne: Sie umfaßt ca. 300-400 Aminosäurereste, in der acht Motive K-R vorkommen. Diese sind weniger stark konserviert als die reaktiven Strukturen der Adenylierungs- und Thiolierungsdomäne. In dieser Domäne fällt besonders das M-Motiv mit zwei konservierten Histidinresten (HHIIxDGxSxxIL) auf. Aufgrund von Sequenzhomologien dieses Motivs zuentsprechenden funktionellen Domänen von Enzymen, wie z.B. der Chloramphenicol-Acetyltransferase, wird diesem Motiv eine Beteiligung bei der Peptidyl- und Acyltransferreaktion zugeordnet (Fuma *et al.* 1993, Stachelhaus und Marahiel 1995, Pfeifer *et al.* 1995, de Crécy-Lagard *et al.* 1995, Stein und Vater 1996, Stachelhaus *et al.* 1998, Belshaw *et al.* 1999).

Peptid-Synthetasen akzeptieren ihre Substrataminosäuren in der Regel nur in der L-Form. Es konnte gezeigt werden, daß die Peptidsynthese durch die Zugabe der Substrataminosäure in der D-Form gehemmt wird (Ullrich *et al.* 1991). Die Umwandlung der Substrataminosäure von der L- in die D-Form wird an Modulen mit einer Epimerisierungsdomäne katalysiert und erfolgt sehr wahrscheinlich auf der Stufe des als Thioester gebundenen Substrates (Stein *et al.* 1995, Marahiel *et al.* 1997). Eine solche Domäne unterscheidet sich von der Elongationsdomäne in der Sequenz der konservierten Motive (s. Abb. 1-2). Man nimmt an, daß die basischen Aminosäurereste in den Motive N-R für die Epimerisierung verantwortlich sind (Stein *et al.* 1995, Marahiel *et al.* 1997).

Bei einigen Synthetasen wurde eine Domäne mit einer N-Methyltransferaseaktivität identifiziert, die für die N-Methylierung von Aminosäuren verantwortlich ist.

N-methylierte Aminosäuren sind z. B. Bestandteil von Cyclosporin A und Enniatin. Dieses Segment umfaßt ca. 450 Aminosäuren und liegt zwischen den Motiven G und H (Haese *et al.* 1993).

Die Funktion der konservierten Motive der Domänen wurde durch Mutagenese (Vollenbroich *et al.* 1993 und 1994, Gocht und Marahiel 1994), Affinitätsmarkierungen und durch partielle Proteolyse von Peptid-Synthetasen (Pavela-Vranic *et al.* 1994 a/b) untersucht. Es konnte anhand von Strukturhomologien gezeigt werden, daß die Adenylierungsdomäne von Peptidsynthetasen hohe Homologien zu Luziferasen und Acyl-CoA-Ligasen aufweist. Durch die Aufklärung der Raumstrukturen der Luziferase aus *Photinus pyralis* (Conti *et al.* 1996) und der Aminoacyl-Adenylierungsdomäne der Gramacidin S Synthetase I (Conti *et al.* 1997) wurden die katalytisch aktiven Aminosäurereste identifiziert und die Reaktionen in der Aminoacyl-Adenylierungsdomäne auf molekularer Basis beschrieben. Es wurde gezeigt, daß diese Enzyme in zwei Sub-Domänen unterteilt werden können. Die konservierten Motive B-F bilden eine große aminoterminal, die Motive G-I eine kleinere carboxyterminale Domäne.

1.4 Phosphopantetheinyl-Transferasen

Bei Polyketid-, Fettsäure-Synthasen und Peptidsynthetasen sind an der Übertragung von Acylgruppen 4'-PPan-Kofaktoren beteiligt. Diese sind an Acyl- bzw. Peptidyl-Carrier-Proteine gebunden, die entweder integrierte Domänen oder separate Proteine darstellen und eine Größe von 80-100 Aminosäuren aufweisen. Für diese Funktionseinheiten ist die Sequenz (L,V)(G,L)(G,A,F)(D,H,K,E)S(L,Q)(D,A,G) charakteristisch ist (Stein *et al.* 1996). Bei Peptidsynthetasen entspricht dieses Segment der Thiolierungsdomäne. Die Carrier-Proteine müssen posttranslational modifiziert werden, um katalytisch aktiv zu sein. Dabei werden sie von der inaktiven apo-Form in die aktive holo-Form überführt. Dies geschieht mit Hilfe von Phosphopantetheinyl-Transferasen (Lambalot *et al.* 1996), die 4'-Phosphopantethein von Coenzym A auf das konservierte Serin des Thiolierungsmotivs übertragen (s. Abb. 1-3).

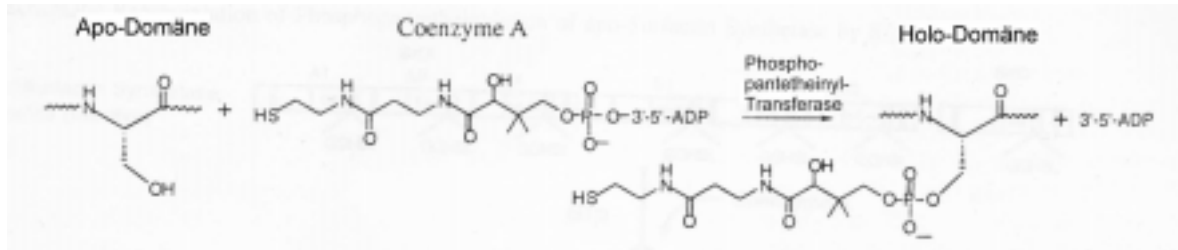


Abbildung 1-3: **Reaktionsschema der Umwandlung des inaktiven apo-ACP in seine aktive holo-Form.**

Diese posttranslationale Umwandlung wird durch die von einer Phosphopantethein-Transferase katalysierten Übertragung von 4'-Phosphopantethein von Coenzym A auf den konservierten Serinrest des Thiolierungsmotivs unter Freisetzung von 3'5'-ADP durchgeführt. (Darstellung entnommen und modifiziert aus Quadri *et al.* 1998)

Die für die Aktivierung der Surfactin-Synthetase zuständige Phosphopantetheinyl-Transferase Sfp, wird 4 kb C-terminal entfernt vom *srfA*-Operon kodiert (Nakano *et al.* 1992, Cosmina *et al.* 1993). *B. subtilis*-Stämme, denen Sfp fehlt (*sfp*[°]), können in *trans* mit den Transferasen Gsp aus dem Gramicidin S-Biosynthesesystem (Borchert *et al.* 1994) bzw. EntD aus dem Enterobactin-Biosynthesesystem (Grossman *et al.* 1993) komplementiert werden. Untersuchungen mit Sfp zeigten, daß es in der Lage ist, unterschiedliche ACPs und PCPs von der inaktiven apo-Form in die aktive holo-Form zu überführen (Quadri *et al.* 1998, Weinreb *et al.* 1998). Sfp wurde kristallisiert (Modif *et al.* 1999) und seine Struktur aufgeklärt (persönliche Mitteilung von Prof. Marahiel).

1.5 Thioesterasen

Am C-terminalen Ende des letzten Moduls von Peptid-Synthetasen und Polyketid-Synthetasen befindet sich eine Aminosäuresequenz, die eine hohe Homologie zu Thioesterasen aufweist. Diese Sequenzen enthalten das Motiv GxSxG. Man vermutet, daß diese Domänen für die Freisetzung des fertigen Produktes vom Enzym notwendig sind (Turgay *et al.* 1992, Cosmina *et al.* 1993, Mootz und Marahiel 1997, Shaw-Reid *et al.* 1999). Es wurde gezeigt, daß die Deletion der C-terminalen Thioesterase-Sequenz im Surfactin-Operon eine drastische Reduzierung der Surfactin-Produktion und zwar 2,9 % im Vergleich zum Wildtyp ATCC 21332 zur Folge hat (Schneider und Marahiel 1998).

De Ferra *et al.* zeigten, daß durch eine Versetzung der C-terminalen Thioesterasedomäne an das C-terminale Ende interner aminosäureaktivierender Module dieses Operons verkürzte Lipopeptide synthetisiert wurden (de Ferra *et al.* 1997). Bei Polyketidsynthasen konnte ebenfalls, durch Versetzen der C-terminalen Thioesterase an eine andere Position im Operon, die Synthese verkürzter Produkte beobachtet werden (Cortes *et al.* 1995, Gokhale *et al.* 1999, Butler *et al.* 1999). Außer der integrierten Thioesterase findet man bei prokaryotischen Peptidsynthetasen noch eine externe Thioesterase, die eine hohe Homologie zu Typ-II Fettsäure-Thioesterasen aus Vertebraten aufweist, wie z.B. SrfD bei der Surfactin-Biosynthese und GrsT bei der Gramicidin S-Biosynthese. Diese Proteine besitzen Molmassen zwischen 25-29 kDa. Ihre Funktion ist noch ungeklärt. Es wurde gezeigt, daß die Surfactinproduktion um 80 % reduziert wird, wenn SrfD deletiert wird (Schneider und Marahiel, 1998). Es konnte auch für das Polyketid Tylosin gezeigt werden, daß die Deletion der externen Thioesterase TylO eine 85 % ige Reduktion der Synthese des Endproduktes zur Folge hatte (Butler *et al.* 1999). Eine mögliche Funktion der externen Thioesterasen wurde von Butler *et al.* aufgezeigt. Sie vermuten, daß TylO eine „proof reading“-Funktion ausübt, indem sie falsche Precursoren entfernt (Butler *et al.* 1999).

Es wurde von F. Leenders gezeigt, daß die externe Thioesterase sehr wahrscheinlich an der Zyklisierung der Peptidprodukte beteiligt ist (Leenders, 1999). Durch Zugabe von heterolog exprimiertem 6xHis-GrsT zu einem zellfreien Biosynthesesystem von Gramicidin S hat er mittels MALDI-MS Oligomere des Pentapeptides (Phe-Pro-Val-Orn-Leu) von Gramicidin S nachgewiesen.

1.6 Surfactin

Surfactin ist ein Lipopeptid, das von verschiedenen *Bacilli* produziert wird. Es besteht aus sieben α -Aminosäuren und einer β -Hydroxyfettsäure mit variabler Kettenlänge von 13-15 Kohlenstoffatomen. In der Natur kommt es als ein Gemisch verschiedener Strukturisomere vor (s. Abb. 1-1), dessen Zusammensetzung durch externe Faktoren, wie z. B. Nährmediumzusammensetzung oder physikalisch-chemische Faktoren beeinflusst wird (Kluge *et al.* 1988).

Das *srfA*-Operon (s. Abb. 1-4) kodiert die Enzyme, die für die Biosynthese von Surfactin notwendig sind. Es wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen charakterisiert (Cosmina *et al.* 1993, Fuma *et al.* 1993, Nakano *et al.* 1991). Es umfaßt 27 kb und besitzt vier offene Leserahmen. Das erste Gen kodiert SrfA, das die Aminosäuren Glutaminsäure und Leucin im Verhältnis 1:2 aktiviert. Das zweite Gen kodiert SrfB. Es ist für die Aktivierung von Valin, Asparaginsäure und Leucin im Verhältnis 1:1:1 verantwortlich. SrfC wird vom dritten Gen kodiert und aktiviert Leucin. Das vierte Gen kodiert SrfD, dessen Funktion noch nicht geklärt ist.

Durch Sequenzvergleiche konnte gezeigt werden, daß die Enzyme SrfA, SrfB und SrfC modular aufgebaut sind und die für Peptidsynthetasen charakteristischen konservierten Sequenzmotiven aufweisen (Cosmina *et al.* 1993, Krätzschmar *et al.* 1989, Mittenhuber *et al.* 1989, Turgay *et al.* 1992).

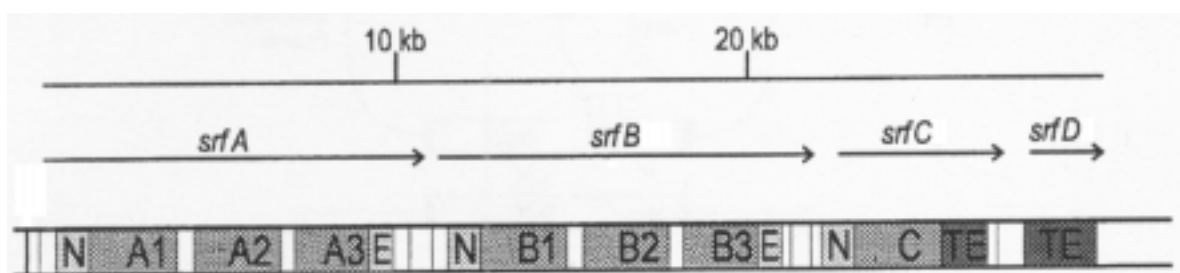


Abbildung 1-4: Schematische Darstellung des *srfA*-Operon.

Die vier offenen Leserahmen, *srfA*, *srfB*, *srfC* und *srfD* sind durch Pfeile dargestellt. Der modulare Aufbau ist grau unterlegt schematisch dargestellt. N kennzeichnet eine N-terminale Elongationsdomäne, E bezeichnet eine Epimerisierungsdomäne und TE steht für Thioesterase homologe Domänen. A1-A3, B1-B3 und C stellen die sieben Aminosäure-aktivierenden Module der Surfactin-Synthetase dar.

1.7 Biosynthese von Surfactin

Die Biosynthese von Surfactin beginnt in der logarithmischen Wachstumsphase von *B. subtilis* OKB 105 und erstreckt sich über die gesamte Wachstumszeit. Die Charakterisierung erfolgte anhand der Reaktionen der vier Surfactin-Synthetase-Teilenzyme. E1, das sich aus den Teilenzymen E1A und E1B zusammensetzt, E2 und einer postulierten Acyltransferase E3 (Ullrich *et al.* 1991, Menkhaus *et al.* 1993). Durch Insertions- und Transposonmutationen bzw. ortsspezifische Mutagenesen wurde gezeigt,

daß die Teilenzyme E1A, E1B und E2 den vom Surfactin-Operon kodierten Proteinen SrfA-C entsprachen (Vollenbroich *et al.* 1993 und 1994). Das E3-Protein wird nicht durch das Surfactin-Operon kodiert.

Die Biosynthese von Surfactin wird durch das Multiple Carrier Modell beschrieben. Die Surfactin-Synthetase akzeptiert ihre Substrataminosäuren nur in der L-Form. Es wurde gezeigt, daß die *in vitro*-Surfactin-Biosynthese durch die Zugabe von D-Aminosäuren inhibiert wird (Ullrich *et al.* 1991). Die Aminosäure L-Leucin in Position drei und sechs wird an den Epimerisierungsdomänen der Surfactin-Synthetase-Teilenzyme SrfA und SrfB in die D-Form umgewandelt. Untersuchungen des *srfA*-Operons durch ortsspezifische Mutagenese zeigten, daß das Serin im J-Motiv essentiell für die Synthese von Surfactin ist, wie es an den ersten vier Thiolierungsdomänen des Surfactinoperons gezeigt wurde (Vollenbroich *et al.* 1993 und 1994). Die Biosynthese von Surfactin wird durch die Reaktion zwischen dem CoA-Thioesterderivat der β -Hydroxytetradecansäure und dem Glutaminsäure-aktivierenden Modul des SrfA gestartet, wobei sich β -Hydroxy-Acylglutamat als Initiationsprodukt bildet (Ullrich 1991, Menkhaus *et al.* 1993). Für den Transfer des Fettsäuresubstrats wird eine Acyltransferase postuliert, die die β -Hydroxytetradecansäure bindet und auf das Glutaminsäure-aktivierende Modul von SrfA überträgt. Die bisherigen Untersuchungen zeigten, daß die Enzyme SrfA, SrfB und SrfC allein nicht in der Lage sind, die *in vitro*-Surfactin-Biosynthese zu initiieren. Erst nach Zugabe der durch AcA34-Gelfiltration erhaltenen E3-Fraktion eines zellfreien Rohextraktes von *B. subtilis* OKB 105 konnte *in vitro*-Surfactin-Biosynthese nachgewiesen werden (Ullrich *et al.* 1991, Menkhaus *et al.* 1993). Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde von M. Menkhaus ein Protein aus der E3-Fraktion von *B. subtilis* OKB 105 aufgereinigt und N-terminal ansequenziert (Menkhaus, 1995), das noch genauer charakterisiert werden muß. In der Diplomarbeit von M. Wehland ergaben sich durch eine weitere Fraktionierung von E3 mit Hilfe von hochauflösender Anionenaustauscherchromatographie an MonoQ HR 5/5 Hinweise auf mindestens drei Enzymaktivitäten, die in der Lage waren, die *in vitro*-Surfactin-Biosynthese zu stimulieren (Wehland 1996). Aus der inzwischen bekannten *B. subtilis*-Genomsequenz ergaben sich keine direkten Hinweise auf eine Acyltransferase, die der Initiationsreaktion der Surfactin-Biosynthese zugeordnet werden kann (Kunst *et al.* 1997).

1.8 Acyltransferasen

Acyltransferasen haben ein breites Funktionsspektrum. Sie katalysieren den Transfer von Acylgruppen auf Coenzym A, Peptide und Proteine unter Bildung von Thioestern, Estern und Amidien. Es wurden bei Acyltransferasen drei unterschiedliche Konsensusmotive, GxSxG, LPxLPxPxL und HX₄D, identifiziert.

Das GxSxG-Motiv wurde auch in Lipasen/Esterasen nachgewiesen. Sehr wahrscheinlich stellt diese Sequenz das Reaktionszentrum dieser Enzyme dar (Brenner 1988). Die anschließende Esterhydrolyse verläuft dann über eine (Asparaginsäure/Glutaminsäure)-Histidin-Serin Triade, die für die katalytischen Reaktionen der Enzyme notwendig ist (Brady *et al.* 1990, Winkler *et al.* 1990).

Das HX₄D-Motiv wurde bei membrangebundenen Phospholipid-Acyltransferasen gefunden (Hanke *et al.* 1995, Kume und Shimizu 1997, Heath *et al.* 1997, Heath und Rock 1998). Durch Mutationsstudien konnte gezeigt werden, daß das Histidin in diesem Motiv für die Funktion dieser Proteine essentiell ist und wahrscheinlich als Protonenakzeptor dient. Die weitere Reaktion läuft, wie bei den Acyltransferasen mit dem GxSxG Motiv über eine Asparaginsäure-Histidin-Serin Triade (Brady *et al.* 1990, Winkler *et al.* 1990).

Das LPxLPxPxL-Motiv wurde bei Carnitin-Acyltransferasen nachgewiesen. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um die Bindungsstelle für Cholin- bzw. Carnitin. Carnitin-Acyltransferasen katalysieren den Transport von Fettsäuren durch die Mitochondrienmembran (Finocchiaro *et al.* 1991, Stemple *et al.* 1998).

2 Problemstellung

Die Surfactin-Biosynthesegene SrfA, SrfB und SrfC wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen charakterisiert (Cosmina *et al.* 1993, Fuma *et al.* 1993, Nakano *et al.* 1991). Es konnte gezeigt werden, daß die Biosynthese des Lipopeptids Surfactin nicht-ribosomal verläuft. Die Initiationsreaktion der Surfactin-Biosynthese ist noch unbekannt. In den Arbeiten von Ullrich *et al.* und M. Menkhaus (Ullrich *et al.* 1991, Menkhaus 1995) wurde gezeigt, daß *in vitro*-Surfactin-Biosynthese erst durch Zugabe einer E3-Fraktion erfolgt. Hieraus wurde im Rahmen der Dissertation von M. Menkhaus ein

Protein partiell aufgereinigt und N-terminal ansequenziert (Menkhaus 1995). Um dessen Funktion aufzuklären, sollte seine Gensequenz ermittelt und das Protein heterolog exprimiert werden, um dann seinen Einfluß auf die *in vitro*-Surfactin-Biosynthese zu überprüfen.

Das Ziel dieser Arbeit bestand ferner darin, die für die Initiation der *in vitro*-Surfactin-Biosynthese postulierte Acyltransferase zu charakterisieren. Dazu wurden *in vitro*-Surfactin-Biosynthese-Untersuchungen mit den durch AcA34-Gelfiltration und hochauflösende Anionenaustauscherchromatographie aufgereinigten Surfactin-Synthetase-Teilenzyme durchgeführt. Um die Funktion der postulierten Acyltransferase auf die Initiation der *in vitro*-Surfactin-Biosynthese untersuchen zu können, wurde das Glutaminsäure-aktivierende Modul und entsprechende Mutanten gentechnisch hergestellt. Diese Konstrukte wurden vor allem deswegen verwendet, um auszuschließen, daß eines der Surfactin-Synthetase-Teilenzyme mit einer Acyltransferase assoziiert vorlag. Sie wurden an ihrem C-Terminus mit sechs Histidinresten markiert, was eine Aufreinigung durch Affinitätschromatographie an einer Nickel-NTA-Matrix ermöglichte.

Das Surfactin-Operon enthält ein Gen, *srfD*, das ein Protein mit hoher Homologie zu Fettsäure-Thioesterasen von TypII aus Vertebraten kodiert. Die Funktion dieses Genproduktes bei der Surfactin-Biosynthese konnte bisher noch nicht ermittelt werden. Die Expression vom SrfD in *B. subtilis* sollte nachgewiesen werden. Für Funktionsstudien wurde SrfD gentechnisch hergestellt. Es wurde in einen Expressionsvektor kloniert, in *E. coli* transformiert und anschließend exprimiert. Es sollte vor allem der Einfluß dieses Proteins auf die zellfreie Surfactin-Biosynthese mit Hilfe kinetischer Messungen untersucht werden.

3 Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Feinchemikalien und Lösungsmittel

Acrylamid, ultra pure	BIOMOL, Hamburg
Adenosin-5'-triphosphat	Roche Diagnostics, Mannheim
Agarose, ultra pure	Biorad, München
Agar-Agar	Merck, Darmstadt
Ameisensäure	Merck
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck
Ammoniumsulfat	Merck
Bacto-Trypton	Difco, Detroit
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat	Roche Diagnostics
Coenzym A (Lithium-Salz)	Sigma, Deisenhofen
Comassie/Serva Blau G und R	Serva
di-Kaliumhydrogenphosphat	Merck
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck
Dithioerythritol (DTE)	BIOMOL
3,3'-Dithiobis(6-nitrobenzoesäure) (DTNB)	Serva
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck
Essigsäure	Merck
Ethanol	Merck
D(+)-Glucose	Merck
L-Glutaminsäure	Merck
Glycerin	Merck
Glycin	Sigma
Harnstoff	Amersham-Pharmacia Biotech, Freiburg
Hefeextrakt	Difco, Augsburg
2-Mercaptoethanol	Sigma
Methanol	Merck
N,N'-Methylen-bis-acrylamid	Sigma
Natriumdodecylsulfat (SDS)	LKB, Uppsala, Schweden
Natronlauge (1N)	Merck
4-Nitrotetrazoliumchloridblau	Roche Diagnostics
Phosphorsäure (35 %) ultra pure	Merck
PMSF	Serva
Prestained Marker (Eichproteine für PAGE)	Sigma
Quicksafe-N-Szintillationscocktail	Zinsser Analytik, Frankfurt
Saccharose	Merck
Salzsäure (1N)	Merck
Streptomycinsulfat	Sigma
N,N,N',N',-Tetramethylenethylendiamin (TEMED)	Serva
Trichloressigsäure	Merck
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	BIOMOL
Triton X-100	Merck

3.1.2 Radiochemikalien

L-[¹⁴ C]Leucin (307 Ci/mol)	Amersham-Buchler, Braunschweig
L-[¹⁴ C]Glutaminsäure (257 Ci/mol)	Amersham-Buchler
[³² P]Pyrophosphat	DuPont/NEN, Bad Homburg

3.1.3 Enzyme und Kits

Restriktionsendonukleasen	GIBCO BRL, Eggenstein
	Stratagene
	MBI Fermentas
DNase	Sigma
RNase	Roche Diagnostics
T4-DNA-Ligase	GIBCO BRL
Lysozym	Sigma
Polymerase (Taq-, Combipol-Polymerase)	InViTek, Berlin,
JETsorb DNA Extraction Kit	GENOMED, Bad Oeynhausen
Plasmid Präparation Kit	GENOMED
TOPO-TA Cloning Kit	Invitrogen, Niederlande
PRISM™ Ready Reaction	DyeDeoxy™ Applied Biosystems, Weiterstadt
Terminator Cycle Sequencing Kit	
Anti-Rabbit-IgG-alkalische Phosphatase-Konjugat	Sigma

Anti-SrfD-Seren wurden in Kaninchen von der Firma BioGenes, Berlin, mit überexprimiertem SrfD aus *E. coli* DH5 α -pMal™-c2-SrfD als Antigen, hergestellt.

3.1.4 Säulenmaterial

NI-NTA-Agarose-Resin	Qiagen, Hilden
Amylose	Sigma
MonoQ HR5/5	Amersham-Pharmacia Biotech
Ultrogel AcA34	Serva

3.1.5 Geräte

Agarosegelelektrophoresekammer	Eigenbau des Instituts
Flüssigszintillationszähler Tri Carb 1600 CA	Packard
FPLC-Apparatur	Amersham-Pharmacia Biotech
French Press	Aminco, Maryland USA
French-Press-Zelle 18340	Aminco
Imaging-System	Herolab, Wiesloch
Herolab E.A.S.Y.plus	
Sorvall Kühlzentrifuge RC 5C (Rotoren: GSA und SS34)	Sorvall, Bad Homburg
ELISA Reader	Dynatech, Denckendorf
SDS-PAGE-Mighty Small II	Hoefer Scientific, San Francisco, USA
Applied Biosystems Sequencer	ABI, Weiterstadt
Spektralphotometer 556	Perkin Elmer
Tischzentrifuge 3200	Eppendorf
Thermocycler Uno-Thermoblock	Biometra, Göttingen

TLC-Linear Analyser "Tracemaster 20"	Berthold, Wildbach
Transluminator Biometra TI 1	Biometra
Vakuumpumpe SVC 100H	Savant
(Speed Vac Concentrator mit Ölpumpe)	

3.1.6 Membranen

Glasfaserfilter GF92	Schleicher&Schüll, Dassel
Membranfilter ME25 (0,45 µm)	Schleicher&Schüll
Nitrocellulose Membranfilter	Schleicher&Schüll
Visking Dialyseschlauch (15 kDA)	Serva

3.1.7 Bakterienstämme und Plasmide

<i>Bacillus subtilis</i> OKB 105	P. Zuber, Louisiana State University, USA
<i>E. coli</i> DH5α	Hanahan, 1983
pProEx	Gibco, BRL
pMal TM -c2	New England Biolabs, Schwalbach

3.2 Methoden

3.2.1 Synthese von 3-Hydroxytetradecanoyl-Coenzym A

Für die Synthese von 3-Hydroxytetradecanoyl-Coenzym A (β -HA-CoA) wurde das Protokoll von Blecher für die Synthese von Palmitoyl-CoA modifiziert (Blecher 1981). Der dafür benötigte 3-Hydroxytetradecansäure-N-hydroxysuccinimidester wurde nach dem Protokoll von Hiramoto synthetisiert (Hiramoto *et al.* 1971).

Es wurden 49,9 µmol CoA-SH (Li-Salz) in 1,2 ml 0,67 M NaHCO₃ mit 100 µmol D- β -Hydroxyfettsäuresuccinimidester in 2 ml THF versetzt und 4 h bei RT abgedunkelt gerührt. Durch Ansäuern mit 5 % iger Perchlorsäure wurde die Lösung geklärt, in der Vakuum-Zentrifuge eingengt und das Produkt mit 8 ml 5 % iger Perchlorsäure bei 4°C gefällt. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert (5 min, 7500 Upm SS34 Rotor) und anschließend mit 0,8 % iger Perchlorsäure und mit Aceton gewaschen. Das Präzipitat wurde 30 min im Exsikkator über KOH getrocknet, und in 1 ml Kaliumphosphat-Puffer (pH 5,3) aufgenommen. Die Konzentration von β -HA-CoA wurde durch seine UV-Absorption ($\lambda_{232\text{ nm}} = 9100\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$, $\lambda_{260\text{ nm}} = 16200\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) bestimmt.

3.2.2 Zellanzucht

Die Medien für die Zellanzucht wurden zur Sterilisation 20 min bei 121°C autoklaviert. Stammlösungen von Antibiotika wurden sterilfiltriert (0,2 µm).

3.2.2.1 Anzucht von *Bacillus subtilis* OKB 105

Landy-Medium: 5 g/l Glutaminsäure; 0,5 g/l MgSO₄ x 7 H₂O; 0,5 g/l KCl; 1 g/l Hefeextrakt; 2 g/l Phenylalanin; 500 µl/l 1 % MnSO₄; 16 µl/l 1 % CuSO₄; 15 µl/l 1 % FeSO₄; 20 g/l Glucose; 1 g/l KH₂PO₄ (Glucose und KH₂PO₄ wurden getrennt sterilisiert)

Die Anzucht der Zellen erfolgte im modifizierten Landy Medium (Landy *et al.* 1948). Die Zellen wurden auf Landy-Agarplatten angeimpft und 3 Tage bei 29°C inkubiert. Mit diesen Zellen wurde eine Vorkultur hergestellt, mit der die 500 ml Hauptkultur angeimpft wurde. Die Zellen wurden 8 h fermentiert, durch Zentrifugation geerntet und anschließend bei -20°C aufbewahrt. Vor- und Hauptkultur wurden bei 29°C und 200 U/min in einem New Brunswick G25-Schüttler inkubiert.

3.2.2.2 Anzucht von *Escherichia coli* DH5α

2xTY-Medium: 16 g/l Trypton; 10 g/l Hefeextrakt; 5 g/l NaCl

Für die Anzucht von *E.coli* DH5α wurden 200 ml Medium mit 2 ml einer Übernacht-Kultur angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 inkubiert. Die Proteinexpression wurde durch die Zugabe von Isopropyl-β-D-Thiogalactosid (0,2 mM) induziert. Die Zellen wurden nach der Induktion noch 5 h inkubiert, durch Zentrifugation geerntet (10 min 5000 Upm im GSA Rotor) und bei -20°C gelagert.

3.2.3 Herstellung eines zellfreien Rohextraktes aus *Bacillus subtilis* OKB 105

3.2.3.1 Zellaufschluß

Aufschlußpuffer: 50 mM Tris/HCl (pH 7,5); 1 mM EDTA; 5 mM DTE;
20 % (w/v) Saccharose

Die *Bacillus subtilis* OKB 105 Zellen wurden im dreifachen Volumen des Aufschlußpuffer aufgenommen und unter Rühren aufgetaut. Die Suspension wurde 10 min mit Lysozym (4000 U/ ml) bei 30°C behandelt. Der Aufschluß erfolgte mit Hilfe einer French-Press-Zelle bei 4000 psi. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (30 min, 16.000 Upm im SS34 Rotor) vom Überstand abgetrennt.

3.2.3.2 Nukleinsäurefällung

Im Überstand von 3.2.3.1 wurde anschließend eine Streptomycinsulfatkonzentration von 1 % (w/v) eingestellt und 30 min bei 4°C gerührt. Das Nukleinsäure-Präzipitat wurde durch Zentrifugation (30 min, 18000 Upm im SS34-Rotor) abgetrennt.

3.2.3.3 Ammoniumsulfatfällung

Dialysepuffer: 50 mM Tris/HCl (pH 7,5); 0,25 mM EDTA; 5 mM DTE;
10 % (w/v) Saccharose

Zur Fällung der Proteine wurde eine 70 % ige Ammoniumsulfatkonzentration im Überstand von 3.2.3.2 eingestellt und 30 min bei 4°C gerührt. Die gefällten Proteine wurden durch Zentrifugation (30 min, 18000 Upm im SS34-Rotor) abgetrennt. Der Niederschlag wurde im Dialysepuffer aufgenommen und 3 x 1h gegen diesen Puffer dialysiert. Die erhaltene Protein-Lösung wird als Rohextrakt bezeichnet.

3.2.3.4 Gelpermeationschromatographie an Ultrogel AcA34

Elutionspuffer: 50 mM Tris/HCl (pH 7,5); 0,25 mM EDTA;
10 % (w/v) Saccharose

8 ml des Rohextraktes wurden auf eine Ultrogel AcA34-Säule (3cm Ø, 42 cm Länge, Gesamtvolumen $V_t = 300$ ml) aufgetragen und mit Elutionspuffer bei einer Flußrate von 20 ml/h eluiert. Das Fraktionsvolumen betrug 4 ml.

3.2.3.5 Anionenaustauscher-FPLC an Pharmacia MonoQ

Puffer A: 50 mM Tris/HCl (pH 7,5); 5 mM DTE
Puffer B: 50 mM Tris/HCl (pH 7,5); 5 mM DTE; 0,5 M NaCl

Die MonoQ HR 5/5- Säule wurde mit Puffer A äquilibriert. Nach dem Auftragen der Probe wurde die Säule mit 10 ml Puffer A gewaschen. Die Proteine wurden mit einem linearen NaCl-Gradienten (0-0,5 M) eluiert. Sein Gesamtvolumen betrug 50 ml. Die Fraktionsgröße betrug 1 ml bei einer Flußrate von 1 ml/min.

3.2.4 Bestimmung enzymatischer Aktivitäten

3.2.4.1 Aminoacyladenylierung der Substrataminosäuren

ATP/PP_i-Reaktionsmischung: 2 mM ATP; 1 mM DTE; 10 mM MgCl₂; 0,5 mM Na₄P₂O₇; 0,2 µCi [³²P]PP_i; 1 mM Substrataminosäure
Norit A-Lösung: 1,6 % Aktivkohle (w/v); 0,1 M Na₄P₂O₇;
0,35 M Perchlorsäure

Die Aminoacyladenylat-Aktivierung von L-Glu durch das Glutaminsäure-aktivierende Modul und dessen Mutanten wurde mit Hilfe der ATP/PP_i-Austauschreaktion gemessen (Gevers *et al.* 1969, Lee und Lipmann, 1974, Vater *et al.* 1985). 200 µl einer Standardreaktionsmischung enthielten 100 µl Enzymlösung und 100 µl der ATP/PP_i-Austausch-Reaktionsmischung. Dieser Ansatz wurde 10 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Reaktion durch Zusatz von 500 µl einer Norit A Suspension im Eisbad gestoppt. Die in ATP inkorporierte Radioaktivität wurde an Aktivkohle adsorbiert und auf Glasfaserfiltern abfiltriert. Die Filter wurden zweimal mit H₂O gewaschen und 30 min bei 110°C getrocknet. Die Radioaktivität wurde durch Flüssigszintillationszählung gemessen.

3.2.4.2 Thioesterbeladung

Thioester-Reaktionsmischung: 50 mM Tris/HCl (pH 7,8); 2 mM ATP;
10 mM MgCl₂; 0,7 mM EDTA; 5 mM DTE

Die Bildung von Surfactin-Synthetase-Substrataminosäure-Thioester-Komplexen wurde nach der Methode von Gevers gemessen (Gevers *et al.* 1969).

Die Standardreaktionsmischung (200 µl) enthielt 100 µl Enzymlösung, 100 µl Thioester-Reaktionsmischung und 0,5 µCi [¹⁴C]-Substrataminosäure. Die Proben wurden 10 min bei 37°C inkubiert, die Reaktion durch Zugabe von 5 ml einer 5 % igen TCA-Lösung gestoppt und 30 min auf Eis inkubiert. Die präzipitierten Enzym-Aminosäure-Komplexe wurden an Membranfilter adsorbiert. Diese wurden zweimal mit je 5 ml 5% iger TCA und einmal mit H₂O gewaschen. Die Filter wurden 30 min bei 100°C getrocknet und die gebundene Radioaktivität durch Flüssigszintillationszählung gemessen.

3.2.4.3 *In vitro*-Surfactin-Biosynthese

Biosynthese-Reaktionsmischung: 10 mM ATP; 5 mM L-Asp; 5 mM L-Val;
5 mM L-Glu; 0,1 mM L-Leu; 10 mM MgCl₂;
10 mM DTE; 52 mM Tris/HCl (pH 7,3);
1 mM EDTA

Mit Hilfe der *in vitro*-Surfactin-Biosynthese wurde die postulierte Acyltransferase E3 detektiert. Dazu wurden die Surfactin-Synthetase-Teilenzyme SrfA und SrfB (E1) bzw. SrfC (E2) mit den niedermolekularen Fraktionen der AcA34-Gelfiltration komplementiert und auf *in vitro*-Surfactin-Biosynthese getestet.

Der Standardansatz enthielt 55µl E1-Lösung, 55µl E2-Lösung und 48 µl E3-Lösung, 79 µl Biosynthese-Reaktionsmischung und 0,2 mM β-HA-CoA. Es wurden 0,5 µCi L-[¹⁴C]-Leucin eingesetzt. Der Reaktionsansatz wurde 30 min bei 30°C inkubiert. Als Referenz diente ein Ansatz ohne E3. Die Surfactin-Biosynthese wurde durch Zugabe von 0,7 ml einer 3 M Hydroxylamin-Lösung (pH 7,9) und 5 µg Surfactin gestoppt. Danach wurde zur Spaltung der kovalenten Enzym-Substrat-Komplexe 20 min bei 60°C inkubiert. Die Proteine wurden mit 5 ml 5 % iger TCA 30 min auf Eis präzipitiert. Das Präzipitat wurde an Membranfilter adsorbiert. Diese wurden zweimal mit 5 % iger TCA und einmal mit H₂O

gewaschen und danach 30 min bei 100°C getrocknet. Die gebundene Radioaktivität wurde durch Flüssigszintillationsmessung bestimmt.

3.2.4.4 Initiation der *in vitro*-Surfactin-Biosynthese

Für die Untersuchung der Initiation der *in vitro*-Surfactin-Biosynthese wurde die unter 3.2.4.3. beschriebene Reaktionsmischung modifiziert, indem die Lösungen der nicht benötigten Aminosäuren, L-Leu, L-Asp und L-Val, durch Puffer ersetzt wurden. Die Inkubation der Proben wurde, wie unter 3.2.4.3 beschrieben, durchgeführt.

3.2.5 Nachweis von Surfactin

3.2.5.1 Dünnschichtchromatographie von Surfactin und Initiationsprodukten

Zum Nachweis von Surfactin und Initiationsprodukten der *in vitro*-Surfactin-Biosynthese wurde eine Dünnschichtchromatographie (DC) mit anschließendem Radioscanning bzw. einer Autoradiographie durchgeführt. Die Auftrennung erfolgte auf Kieselgel 60-Platten (Merck) im Laufmittelgemisch Chloroform:Methanol:Wasser im Volumenverhältnis 65:25:4.

3.2.5.2 Massenspektrometrische Untersuchung von Surfactin

Die Identifizierung von Surfactin erfolgte mit Hilfe von Matrix-unterstützter Laser Desorptions-Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MS). Die Messungen wurden mit einem Bruker Reflex MALDI-TOF Massenspektrometer am Institut für Biochemie der Freien Universität in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. F. Hucho in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. P. Franke durchgeführt. Das Gerät ist mit einem 337 nm Stickstoff-LASER für die Desorption und Ionisierung ausgestattet. Die erzeugten Ionen wurden mit einer Spannung von 28,5 kV beschleunigt, entsprechend ihrem m/z-Verhältnis im Flugzeitanalysator (TOF) getrennt und detektiert. Als Matrix wurden gesättigte Lösungen von α -Cyano-4-hydroxy-Zimtsäure in 30 % igem wäßrigem Acetonitril in 0,1 % iger TFA verwendet.

3.2.6 Proteinbestimmung

Bradford: 100 mg Serva Blue G250 in 50 ml EtOH (abs);
100 ml 85 % Phosphorsäure; ad 1000 ml mit H₂O

Zur Proteinbestimmung wurde die Methode von Bradford (Bradford, 1976) in modifizierter Form verwendet. Auf einer Mikrotiterplatte wurden 10 µl Proteinlösung, die 10-100 µg/ml Protein enthielten, mit 100 µl filtrierter Bradford-Lösung versetzt. Nach 5 min Inkubation bei RT wurde die Extinktion bei 590 nm gemessen. Für die Auswertung wurde eine Eichkurve mit wässriger BSA-Lösung im Konzentrationsbereich von 10-100 µg/ml aufgenommen.

3.2.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Probenpuffer: 62,5 mM Tris/HCl (pH 6,8); 1% SDS; 10 % (v/v) Glycerin;
5 % Mercaptoethanol
Färbelösung: 0,1 % Serva Blue R; 10 % (w/v) TCA; 50% Methanol;
7,5 % Essigsäure
Entfärber: 30 % Methanol und 7,5 % Essigsäure

Die Auftrennung der Proteingemische wurde mit Hilfe der diskontinuierlichen SDS-PAGE nach Laemmli vorgenommen (Laemmli 1970). Das Sammelgel hatte eine Länge von 1,5 cm und enthielt 4 % Acrylamid. Die Länge des Trenngels betrug 8,5 cm. Es enthielt, abhängig von der Größe der zu trennenden Proteine 5-12,5 % Acrylamid. Die Dicke der Gele betrug 0,75 cm. Die Proteinproben wurden mit Probenpuffer versetzt und 2 min bei 94°C inkubiert. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanten Stromstärken von 10-40 mA. Zur Größenbestimmung der Proteine wurden käuflich erworbene Proteinstandards bekannter Größe im Gel mit aufgetrennt. Die Gele wurden 30 min in der Färbelösung gefärbt und anschließend mit dem Entfärber entfärbt.

3.2.8 Westernblot-Analyse

3.2.8.1 Semidry-Blotting

Blotpuffer: 48 mM Tris/HCl (pH 9,2); 39 mM Glycin; 1,3 mM SDS; 20 % Methanol

Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Proteine auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF) transferiert und immobilisiert. Die Membran wurde vorher mit Methanol benetzt und anschließend im Blotpuffer äquilibriert. Der Transfer wurde in einer LKB Blotkammer 1 h bei einer Stromstärke von 5 mA/cm² durchgeführt.

3.2.8.2 Immunoblotanalyse des SrfD-Proteins

TBS-Puffer: 20 mM Tris/HCl (pH 7,3), 150 mM NaCl

TTBS-Puffer: 0,05 % Tween 20 in TBS

Substratpuffer: 100 mM Tris/HCl (pH 9,5); 100 mM NaCl; 5 mM MgCl₂

Nach dem Elektro-Blotting wurde die Membran in TBS-Puffer mit Zusatz von 2 % Milchpulver 30 min bei RT inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Die Membran wurde anschließend 5 x 10 min in TTBS-Puffer gewaschen und 2 h in TBS-Puffer mit dem SrfD-MBP-Antikörper (Anti-SrfD-MBP-IgG, 1:40000 in TBS) inkubiert. Die Membran wurde erneut mit TTBS-Puffer gewaschen, um überschüssige Antikörper zu entfernen. Daran schloß sich eine zweistündige Inkubation mit dem zweiten Antikörper (Anti-Kaninchen-IgG-alkalische Phosphatase-Konjugat, 1:20000 in TBS) an. Überschüssiger Antikörper wurde durch erneutes Waschen mit TTBS entfernt. Die gebundenen Antikörper-Komplexe wurden durch eine Enzymreaktion sichtbar gemacht. Hierbei wurde 0,15 mg BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat-Toluidin Salz) und 0,25 mg NBT (p-Nitro-blue-tetrazolium-chloride) in 10 ml Substratpuffer inkubiert. Die Färbereaktion wurde durch Waschen mit Wasser gestoppt.

3.2.9 Genetische Methoden

3.2.9.1 Präparation chromosomaler DNA aus *Bacillus subtilis*

TE-Puffer: 10 mM Tris/HCl (pH 7,4); 1 mM EDTA (pH 8,0)

Die Präparation chromosomaler DNA aus *Bacillus subtilis* OKB105 erfolgte aus einer 3 ml 2x TY-Medium Übernacht-Kultur. Die Zellen wurden 1 min bei 13000 Upm (Eppendorf Tischzentrifuge) abzentrifugiert, in 500 µl TE-Puffer resuspendiert und 30 min mit 50 µl Lysozym (1 mg/ml) bei RT inkubiert. Die gebildeten Protoplasten wurden durch Zugabe von 50 µl 10 % igem SDS (w/v) aufgeschlossen. Durch eine anschließende Phenolextraktion (2x mit je 900 µl) wurden die Proteine entfernt. Das überschüssige Phenol wurde durch eine Extraktion mit Chloroform:Isoamylalkohol [24:1] (2x mit je 900 µl) aus der wässrigen DNA-Phase entfernt. Die DNA wurde durch Zugabe von einem Zehntel des Volumens an Na-Acetat (3M) und 1,5 Volumen Ethanol abs. gefällt und durch Zentrifugation (10 min, 13000 Upm, Eppendorf Tischzentrifuge) präzipitiert. Anschließend wurde zweimal mit je 1 ml 70 % Ethanol gewaschen. Das Präzipitat wurde bei 37°C getrocknet und in 50 µl TE-Puffer aufgenommen.

3.2.9.2 Minipräparation von Plasmid-DNA

STET-Puffer: 0,1 M NaCl; 10 mM Tris/HCl (pH 7,4); 1 mM EDTA (pH 8,0);
5 % Triton X-100

1,5 ml einer Bakterienkultur wurden abzentrifugiert (1 min, 13000 Upm, Eppendorf Tischzentrifuge). Der Überstand wurde verworfen und das Präzipitat in 350 µl STET-Puffer resuspendiert. Der Suspension wurden zum Lysieren der Bakterien 20 µl Lysozym (10 mg/ml in 10 mM Tris-HCl, pH 8) hinzugefügt. Die Zellen wurden 1 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 1 min bei 98°C inkubiert, um bakterielle Proteine und hochmolekulare DNA zu denaturieren. Es folgte eine Zentrifugation (10 min, 13000 Upm Eppendorf Tischzentrifuge). Das Präzipitat wurde entfernt. Zur Fällung der noch gelösten Plasmid-DNA wurden 175 µl einer 7,5 M Ammoniumacetat-Lösung und 875 µl Ethanol abs. hinzugefügt. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Plasmid DNA sedimentiert (10 min, 13000 Upm Eppendorf Tischzentrifuge). Das Sediment wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, und in 20 µl TE-Puffer aufgenommen.

3.2.9.3 Präparative Plasmidisolierung

Zur Herstellung gereinigter Plasmid-DNA im präparativen Maßstab wurde eine 100 ml Bakterienkultur angeimpft und unter Schütteln bei 37°C bis zur stationären Phase inkubiert. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation geerntet (10 min, 3000 Upm im GSA-Rotor) und ein alkalischer Zellaufschluß durchgeführt (Sambrook *et al.* 1989). Die Plasmide wurden durch Anionenaustausch-Chromatographie nach der Vorschrift des Herstellers (Genomed) gereinigt.

3.2.9.4 Polymerasekettenreaktion

Bei der Polymerasekettenreaktion (PCR) wird mittels einer thermostabilen DNA-Polymerase der DNA-Bereich zwischen zwei Primern amplifiziert. Die PCR ist eine dreistufige, sich zyklisch wiederholende Reaktion. Die doppelsträngige DNA wird durch Denaturierung in Einzelstränge getrennt, so daß die Primer an die DNA-Matrize hybridisieren können (Annealing) und als Startpunkt für die DNA-Synthese (Elongation) dienen. Dieser Zyklus von Annealing, Elongation und Denaturierung wird ca. 25-35mal wiederholt. Die PCR-Reaktionen wurden, wie folgt, angesetzt.

Matrizen-DNA

Plasmid-DNA	100 bis 200 ng
chromosomale DNA	500 ng bis 1 µg
Polymerase-Puffer (10x)	10 µl
MgCl ₂	5 mM
Primer	je 50 pmol
dNTPs	20 µM
Polymerase	0,4 U
dest.Wasser	ad 100 µl

Geeignete Reaktionsbedingungen wurden jeweils für die einzelnen Primerpaare und die verwendete Polymerase optimiert. Die Anzahl der Zyklen lag zwischen 25 bis 35. Die Denaturierungs- (94°C), Annealing- (45°C bis 60°C) und Elongationsschritte (72°C) betragen jeweils 1 min.

Die verwendeten Primer wurden von den Firmen TIB MOLBIOL, Berlin und BioTeZ Berlin-Buch GmbH bezogen.

Tabelle 2: **Verwendete Primer für die PCR.**

Fett gedruckte Nukleotide bezeichnen eine Schnittstelle für Restriktionsenzyme. Für die Synthese degenerierter Primer wurde der IUB-Code verwendet.

Name	Sequenzen
Macylse	5'- GAA TTC CAR GCI ACN GCI AAR
Inter 15	5'-IAT IGC IGT YAA YTC YTA
Inter 10c	5'-YTC YTC IGC IAG YTC RTC
Inter 10d	5'-YTC YTC IGC YAA YTC RTC
Srf se	5'-CG GGA TCC ATG AGC CAA CTC TTC
Srf rev	5'- AAG CTT CGG TTG AAT GAT CGG ATG
Yur se	5'- GAA TTC AAT TGA GTC AGG CCA CAG CA
Yur rev	5'- CTC GAG ATA CTC AAC TTT CCA CAT
N3-5a	5'-GCG ACA AAG AAT ACA TGA TC
C5-3a	5'-ACT GCA ATT GAC GAT TCA GT
M13 rückwärts Primer	5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC
M13 vorwärts Primer	5'-TAA AAC GAC GGC CAG

3.2.9.5 Inverse Polymerasekettenreaktion

Die inverse PCR wurde eingesetzt, um die unbekanntes 5'- und 3' Enden des 40 kDa Proteins zu amplifizieren. Dazu wurde die chromosomale DNA von *B. subtilis* OKB 105 mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI, *Eco*RI und *Xho*I geschnitten. Durch eine Restriktionsanalyse war bekannt, daß diese drei Restriktionsenzyme keine Schnittstellen in dem bekannten Teil der Sequenz aufwiesen. Die so geschnittene chromosomale DNA wurde zu einem zyklischem Molekül intramolekular ligiert. Zwischen den bekannten Enden lag jetzt das unbekanntes Fragment. Mit Primern, die am Ende der bekannten Sequenz lagen, wurde das Fragment amplifiziert und durch Sequenzierung überprüft. Die so amplifizierten DNA-Fragmente wurden zur Vereinfachung der Sequenzierung in den pCR[®] 2.1-TOPO Vektor von Invitrogen nach den Angaben des Herstellers kloniert.

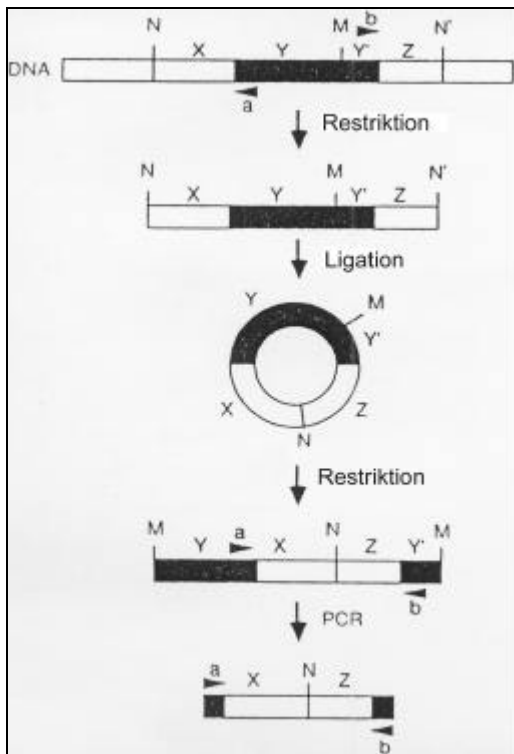


Abbildung 3-1 **Schematische Darstellung der inversen PCR.**

(entnommen und modifiziert aus Triglia *et al.* 1988). Der Balken stellt die genomische DNA dar, wobei der schwarze Teil dem bekannten Teil entspricht. a und b sind die Primer, die benutzt werden, um aus der bekannten Sequenz (schwarz) in die unbekannte Sequenz (farblos) zu amplifizieren. Die DNA wird mit Restriktionsenzymen (N, N') geschnitten und intramolekular ligiert. Das dabei entstehende Plasmid wird erneut mit Restriktionsenzymen (M) geschnitten und kann in die PCR eingesetzt werden, in der jetzt der unbekannte Abschnitt (farblos) zwischen den Primern a und b aus der bekannten Sequenz amplifiziert werden kann.

3.2.9.6 Restriktionsverdau von DNA

Plasmide und PCR-Produkte, die mit Restriktionsstellen versehen waren, wurden mit einer Einheit (1 U) des entsprechenden Restriktionsenzym in dem vom Hersteller angegebenen Puffer 1-2 h bei 37°C geschnitten. Die Analyse sowie die Reinigung der erhaltenden DNA-Fragmente erfolgte anhand der Agarose-Gelelektrophorese.

3.2.9.7 Agarosegelelektrophorese

TAE-Puffer: 40 mM Tris/HCl pH 7,9; 50 mM NaOAc; 1 mM EDTA
 Auftragspuffer: 10 mM Tris-HCl (pH 7,5); 2 mM EDTA;
 15 % (v/v) Glycerin; 0,1 % (w/v) Bromphenolblau

Für die Gele wurde je nach Größe der DNA-Fragmente 0,8 % - 2 % (w/v) Agarose im 1x TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst, und mit 0,25 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 5- 10 V/cm in horizontalen Gelkammern. Die DNA-Proben wurden mit Auftragspuffer versetzt. Zur Größenbestimmung wurde ein

DNA-Standard (100-bp-Leiter) aufgetragen. Die Detektion der aufgetrennten DNA-Fragmente erfolgte im UV-Licht bei einer Wellenlänge zwischen 254 nm-300 nm.

3.2.9.8 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Präparative Agarosegele wurden verwendet, um geschnittene DNA-Fragmente von Nebenprodukten zu reinigen. Die aufgetrennten DNA-Banden wurden unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten. Die Elution der DNA aus dem Gel wurde mit dem Jetsorb-Kit nach Angaben des Herstellers (Genomed) vorgenommen.

3.2.9.9 Ligation

Gereinigte PCR-Produkte und der linearisierte Vektor wurden mit Hilfe der T4-DNA-Ligase im Verhältnis 5:1 ligiert. Die Ligation erfolgte bei 16°C, 16 h in einem 20 µl Ansatz. Die T4-DNA-Ligase wurde nach den Angaben des Herstellers verwendet (Gibco, BRL).

3.2.9.10 Herstellung kompetenter Bakterien

RF1-Puffer: (pH 5,8); 100 mM RbCl; 50 mM MnCl₂; 30 mM CH₃COOK;
10 mM CaCl₂; 15 % (w/v) Glycerin
RF2-Puffer: (pH 6,8); 10 mM MOPS; 10mM RbCl; 120 mM CaCl₂;
15 % (w/v) Glycerin

Zur Herstellung von kompetenten Bakterien wurde eine Vorkultur ca. 1:100 mit 200 ml Medium verdünnt, bei 37°C bis zur exponentiellen Wachstumsphase (0,5 OD₅₅₀) inkubiert und anschließend abzentrifugiert (3000 Upm im GSA-Rotor). Der Überstand wurde entfernt und das Sediment auf Eis in 64 ml kaltem RF1-Puffer suspendiert. Die Suspension wurde 15 min auf Eis inkubiert, und anschließend 10 min bei gleichen Bedingungen wie vorher zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, das Präzipitat in 16 ml RF2-Puffer resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Die kompetenten Bakterien wurden aliquotiert, in einer Mischung aus Trockeneis und Alkohol schnell eingefroren und bei -80°C gelagert.

3.2.9.11 Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli*

Agarplatten 2xTY-Medium mit 15 g/l Bacto-Agar
SOC-Medium: 2 % Bacto-Trypton; 0,5 % Bacto-Hefeextrakt; 10 mM NaCl;
 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 10 mM MgSO₄; 20 mM Glucose
 (Die Mg-Salze und Glucose wurden separat sterilisiert und erst vor
 Gebrauch der Stammlösung zugesetzt).

Der Ligationsansatz wurde zu 100 µl kompetenten Zellen pipettiert und 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock von einer Minute bei 42°C und eine anschließende zweiminütige Inkubation auf Eis. Die Bakteriensuspension wurde danach mit 1 ml SOC-Medium versetzt und 30 min bei 37°C inkubiert. Die Transformationsansätze wurden auf 2xTY-Agarplatten ausgestrichen, die das entsprechende Antibiotikum (Ampicillin) enthielten.

3.2.9.12 DNA-Sequenzierung

Probenpuffer: 5 Teile Formamid : 1 Teil 50 mM EDTA

Die DNA-Sequenzierung erfolgte nach der Methode der Didesoxy-Kettenabbruchreaktion von Sanger (Sanger *et al.* 1977). Die Didesoxynukleotide (ddNTPs), deren Einbau zum Kettenabbruch an einer der vier Basen führt, waren für jede Base mit einem anderen Fluoreszenz-Farbstoff gekoppelt. Es wurde der "1 x PRISM™ Ready Reaction DyeDeoxy™ Terminator Cycle Sequencing"-Kit der Firma Applied Biosystems (Weiterstadt) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Von der zu überprüfenden Sequenz (500 ng Plasmid-DNA oder 30 ng PCR-Produkt) wurden dabei mit nur einem Primer (3,2 pmol) in einem Endvolumen von 20 µl in einer PCR-ähnlichen Reaktion (5 min 94°C, 25 x [20 sec 55°C, 4 min 60°C, 20 sec 94°C]) Einzelstrangabschnitte hergestellt, die durch die Fluoreszenz-markierte ddNTPs terminiert wurden. Nach Beendigung der Reaktion wurde die Lösung mit einem Zehntel des Volumens von NaOAc und 2,5 Volumen Ethanol gefällt. Die Proben wurden nach einmaligem Waschen mit 70 % Ethanol im Vakuum lyophilisiert. Anschließend wurden sie in 4 µl Probenpuffer aufgenommen, 2 min bei 94°C erhitzt und auf Eis gebracht, um ein Renaturieren der DNA zu vermeiden. Die Proben wurden auf ein 5 % Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde 14 h bei 30 W in einem Sequenzierautomaten der Firma ABI durchgeführt. Die aufgetrennten DNA-Banden

wurden dabei während der Elektrophorese detektiert, indem die mit den ddNTPs gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe mit einem Laser angeregt wurden. Durch deren unterschiedliche Emission entstand ein Sequenzierungsmuster, das von einem Computer (Apple, Ismaning) ausgewertet wurde. Die Sequenzdaten wurden mit Hilfe der Programme "Sequence Analysis und Sequence Navigator" (ABI) ausgewertet.

Die Sequenzanalysen wurden am Robert Koch-Institut in der Arbeitsgruppe von Prof. G. Pauli durchgeführt.

3.2.10 Expression rekombinanter Proteine

Für die heterologe Expression rekombinanter Proteine in *E.coli* wurden die Systeme pProEx von Gibco BRL und pMAL[™]-c2 von New England Biolabs nach den Angaben der Hersteller verwendet. Der Vektor pProEx von Gibco BRL besitzt zwischen Startkodon und Polylinker eine Sequenz zur Kodierung von sechs Histidinresten. Das zu exprimierende Protein wird mit 6-Histidin-Resten markiert. Die Aufreinigung des markierten Proteins erfolgte mit Hilfe einer Nickelchelate-Affinitätsmatrix. Beim pMal-c2-Vektor wurde das zu exprimierende Protein mit dem Maltose-bindenden-Protein (MBP) fusioniert. Die Aufreinigung erfolgte in diesem Fall mit Hilfe einer Amylose-Matrix.

3.2.10.1 Affinitätschromatographie N-His₆-YurP an einer Nickelchelate-Matrix

Lysis Puffer:	50 mM Tris/HCl (pH 8,5); 10 mM 2-Mercaptoethanol; 1 mM PMSF
Puffer A:	20 mM Tris/HCl (pH 8,5); 100 mM KCl; 20 mM Imidazol; 10 mM 2-Mercaptoethanol; 10 % (v/v) Glycerin
Puffer B:	20 mM Tris/HCl (pH 8,5); 1 M KCl; 10 mM 2-Mercaptoethanol; 10 % (v/v) Glycerin
Puffer C:	20 mM Tris/HCl (pH 8,5); 100 mM KCl; 100 mM Imidazol; 10 mM 2-Mercaptoethanol; 10 % (v/v) Glycerin

Proteine, die am N-Terminus mit 6-His-Resten markiert waren, wurden an einer Ni-NTA-Agarose-Säule aufgereinigt. Diese Chromatographie wurde nach dem Protokoll der Firma Gibco BRL durchgeführt. Die *E. coli* DH5 α -pProEx-yurP-Zellen wurden im Lysispuffer aufgetaut, und der Zellaufschluss mittels einer French-Press (4000 psi) durchgeführt. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation abgetrennt (30 min, 14000 Upm im SS34-Rotor) und der Überstand auf die NI-NTA-Säule aufgetragen. Diese wurde mit Puffer A

gewaschen und Proteine, die nicht oder nur schwach an die Matrix gebunden waren, wurden durch Waschen mit Puffer B entfernt. Die Elution des Fusionsproteins erfolgte mit Puffer C. Die Fraktionsgröße betrug 1 ml. Die Protein-haltigen Fraktionen wurden vereinigt und bei -20°C gelagert.

3.2.10.2 Affinitätschromatographie von MBP-SrfD an einer Amylose-Matrix

Säulen-Puffer: 20 mM Tris/HCl, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA
Elutions-Puffer Säulen-Puffer + 10 mM Maltose

Proteine, die mit dem Maltose-bindenden-Protein fusioniert waren, wurden über eine Amylose-Matrix (Sigma) aufgereinigt. Die *E. coli* DH5 α -pMALTM-c2-srfD-Zellen einer Übernacht-Kultur wurden abzentrifugiert und das Präzipitat in Säulen-Puffer aufgenommen. Der Zellaufschluß wurde mittels einer French Press bei 4000 psi durchgeführt. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation abgetrennt (30 min 14000 Upm im SS34-Rotor) und der Überstand auf die mit dem Säulen-Puffer äquilibrierte Amylose-Säule aufgetragen. Das Fusionsprotein wurde von der Säule mit Elutions-Puffer abgelöst. Die Fraktionsgröße betrug 3 ml. Die Fraktionen, die das Fusionsprotein enthielten, wurden vereinigt, aliquotiert und bei - 20°C gelagert.

4 Ergebnisse

4.1 Bestimmung der Nukleotidsequenz des 40 kDa Proteins

M. Menkhaus hat ein 40 kDa Protein der E3 Fraktion aus *B. subtilis* OKB 105 partiell aufgereinigt und N-terminal ansequenziert (Menkhaus, 1995). Es wurde postuliert, daß es sich hier um eine Acyltransferase handelt, die die Initiation der Surfactin-Biosynthese katalysiert. Die erhaltene N-terminale Sequenz (SQATAKVNREVQAFLQDLKGKTI) zeigte bei Datenbank-Recherchen (NBRF-Datenbank) keine Homologien mit anderen Proteinen, so daß die Identifizierung dieses Proteins nicht möglich war. Im Rahmen ihrer Diplomarbeit hat E. Mahlitz (Mahlitz, 1997) dieses Protein weiter aufgereinigt. Durch Fragmentierung mit Trypsin und anschließende Sequenzierung wurden interne Sequenzen (SYADELAEER und LTVLDAASYDFTAID) ermittelt, die in den Datenbanken ebenfalls keinem bekannten Protein zugeordnet werden konnten.

Zur Sequenzanalyse und funktionellen Charakterisierung wurde dieses 40 kDa Protein gentechnisch hergestellt. Zu diesem Zweck wurde die Polymerasekettenreaktion (PCR) (3.2.9.4) angewendet. Es wurden die unterstrichenen Bereiche der N-terminalen Aminosäuresequenz SQATAKVNREVQAFLQDLKGKTI (Primer: Macylse) sowie der internen Sequenzen SYADELAEER (Primer: inter 10 c/d) und LTVLDAASYDFTAID (Primer: inter15) in Nukleotidsequenzen übersetzt, wobei die Variabilität des genetischen Kodes berücksichtigt wurde (s. Tab 2). Es wurden 750 ng bzw. 1 µg chromosomale DNA von *B. subtilis* OKB 105 für die PCR eingesetzt. Die Hybridisierung dieser Primer an die chromosomale DNA erfolgte bei drei verschiedenen Temperaturen (46°C, 48°C, 50°C), um die optimalen Hybridisierungsbedingungen zu ermitteln. Es wurden folgende Primerpaar-Kombinationen benutzt:

Macylse: inter 10 c Macylse: inter 10 d Macylse: inter 15

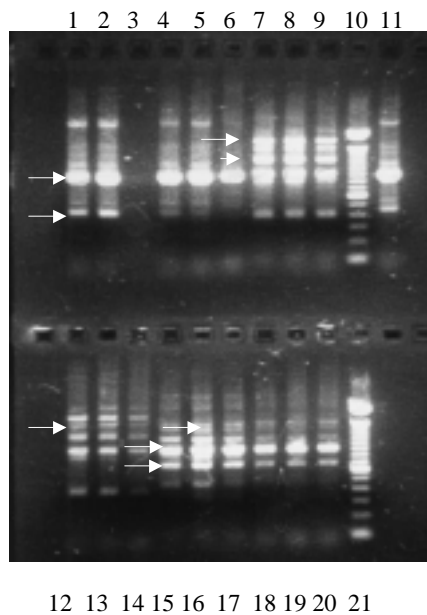


Abbildung 4-1: **Kontrolle der amplifizierten PCR-Produkte mit chromosomaler DNA von *Bacillus subtilis* OKB 105 durch Gelelektrophorese auf einem 1,5% Agarosegel.**

Für die PCR wurde chromosomale DNA von *B. subtilis* OKB 105 mit drei Primerpaaren hybridisiert. In den Spuren 1 bis 6 und 11 wurden die Produkte der PCR-Reaktion des Primerpaares Macylse und inter 15 aufgetrennt. Die Spuren 7 bis 9 und 12 bis 14 zeigen die Produkte der PCR-Reaktion des Primerpaares Macylse und inter 10 c. In den Spuren 15 bis 20 wurden Aliquots der PCR-Reaktion des Primerpaares Macylse und inter 10d aufgetrennt. Es wurden für die PCR 750 ng (Spuren 1, 2, 11, 7 bis 9 und 15 bis 17) bzw. 1 µg chromosomale DNA von *B. subtilis* OKB 105 (Spuren 4 bis 6, 12 bis 14 und 18 bis 20) eingesetzt. Die Hybridisierungstemperatur betrug 46°C (Spuren 1, 4, 7, 12, 15 und 18), 48°C (Spuren 2, 5, 8, 13, 16 und 19) bzw. 50°C (Spuren 11, 6, 9, 14, 17 und 20). Der 100 bp DNA Größenstandard wurde zur Kontrolle in den Spuren 10 und 21 aufgetragen. Durch Pfeile sind die DNA-Banden markiert, die aus dem Agarosegel ausgeschnitten und reamplifiziert wurden.

Aus der Abbildung 4-1 ist ersichtlich, daß mit den Primerpaaren Macylse:inter 10c (Spuren 1-6/11); Macylse:inter 10d (Spuren 7-10/12-14) und Macylse:inter 15 (Spuren 15-20) bei allen Hybridisierungstemperaturen eine PCR-Reaktion beobachtet wurde, wobei jeweils ein Gemisch von DNA-Fragmenten entstand. Da die Sequenzierung des amplifizierten DNA-Gemisches keine eindeutige Sequenz ergeben würde, wurden einige DNA-Banden (durch Pfeile markiert) aus dem Agarosegel ausgeschnitten und die Agarosestücke mit der darin enthaltenen DNA als Matrize direkt für eine neue PCR verwendet. Die amplifizierten DNA-Banden wurden zur Sequenzierung nach den

Angaben des Herstellers in den pCR[®]2.1-TOPO-Vektor kloniert. Aus den dabei entstandenen Klonen wurde durch eine Minipräparation die Plasmid-DNA präpariert (3.2.9.2) und durch einen Restriktionsverdau mit *EcoRI* kontrolliert, ob das Plasmid das gewünschte Insert enthielt. Die Nukleotidsequenz der positiven Klone wurde mit dem M13 Rückwärts-Primer und dem M13 Vorwärts-Primer (s. Tab 2) ermittelt. Die erhaltene DNA-Sequenz ist in Abbildung 4-3 dargestellt.

4.1.1 Bestimmung der 5'- und 3'-Enden der Nukleotidsequenz des 40 kDa Proteins

Die ermittelten Sequenzen des 40 kDa Proteins umfaßten nur die Teilstücke zwischen der N-terminalen Sequenz und den beiden internen Sequenzen. Zur Ermittlung der unbekanntenen Nukleotidsequenzen am 3'- bzw. 5'-Ende dieser Nukleotidsequenzen wurde die inverse PCR angewendet (3.2.9.5). Die chromosomale DNA des *B. subtilis* OKB 105 wurde mit drei unterschiedlichen Restriktionsenzymen (*BamHI*, *EcoRI*, *XhoI*) geschnitten, um das zu sequenzierende DNA-Stück so klein wie möglich zu halten. Durch eine vorherige Restriktionsanalyse war bekannt, daß diese drei Restriktionsenzyme nicht in der bisher ermittelten Sequenz des 40 kDa Proteins schnitten. Die so geschnittene DNA wurde durch Ligation zirkularisiert und mit den Primern N3-5a, C5-3a (s. Tab 2) für die PCR eingesetzt. Es wurde folgendes Temperaturprogramm verwendet (10 min 94°C, 30x[1 min 94°C, 1 min 55°C, 1 min 72°C]).

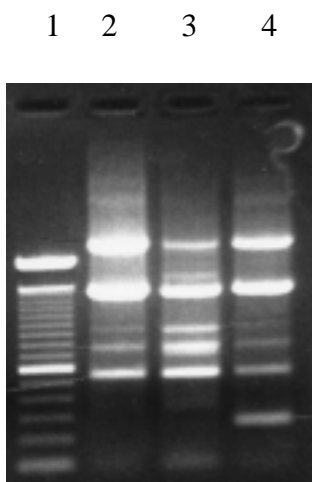


Abbildung 4-2: Gelelektrophorese der mittels inverser PCR amplifizierten Produkte aus chromosomaler DNA von *B. subtilis* OKB 105 auf einem 1,5% Agarosegel.

Die mit den Restriktionsenzymen *BamHI*, *EcoRI* und *XhoI* geschnittene chromosomale DNA von *B. subtilis* OKB 105 wurde ligiert und für die inverse PCR mit den Primern N3-5a und C5-3a verwendet. Spur 2: *BamHI* PCR-Produkte, Spur 3: *EcoRI* PCR-Produkte, Spur 4: *XhoI* PCR-Produkte, Spur 1: 100 bp DNA Größenstandard.

Die durch inverse PCR amplifizierte Produkte aus chromosomaler DNA von *B. subtilis* OKB 105 wurden für die Sequenzierung nach den Angaben des Herstellers in den pCR[®]2.1-TOPO Vektor kloniert. Hierbei wurden die M13 Rückwärts- und M13 Vorwärts-Primer (s. Tab 2) verwendet. Die ermittelte Nukleotidsequenz mit der hiervon abgeleiteten Aminosäuresequenz ist in Abb. 4-3 dargestellt.

1	TTGAGTCAGG AACTCAGTCC M S Q	CGACGGCGAA GCTGCCGCTT A T A K	GGTAAATCGT CCATTTAGCA V N R	GAGGTTCAAG CTCCAAGTTC E V Q	CTTTCCTTGCA GAAAGAACGT A F L Q	GGATTTGAAA CCTAAACTTT D L K	60
61	GGGAAAACCA CCCTTTTGGT G K T	TTGATCATGT AACTAGTACA I D H V	ATTCTTTGTC TAAGAAACAG F F V	GCATGCGGAG CGTACGCCTG A C G	GGTCTTCTGC CCAGAAGACG G S S A	CATTATGTAT GTAATACATA I M Y	120
121	CCGAGTAAGT GGGTCATTCA P S K	ATGTGTTTGA TACACAAACT Y V F D	CAGAGAGTCA GTCTCTCAGT R E S	AAATCAATAA TTTAGTTATT K S M	ACTCCGATCT TGAGGCTAGA N S D L	CTACAGCGCC GATGTCGCGG Y S A	180
181	AACGAATTTA TTGCTTAAAT N E F	TTCAGCGCAA AAGTCGCGTT I Q R N	CCCTGTTTCA GGGACAAGTC P V Q	CTTGGTGAAA GAACCACTTT L G E	AGTCTCTTGT TCAGAGAACA K S L V	TATTTTGTGC ATAAACACG I L C	240
241	TCGCATTCCG AGCGTAAGCC S H S	GAAATACCCC CTTTATGGGG G N T P	GGAGACAGTC CCTCTGTCCG E T V	AAAGCTGCTG TTTCGACGAC K A A	CGTTTGCAAG GCAAACGTTT A F A R	GGGCAAGGGC CCCCTTCCCG G K G	300
301	GCACTTACGA CGTGAATGCT A L T	TTGCGATGAC AACGCTACTG I A M T	GTTTAAACCG CAAATTTGGC F K P	GAGTCTCCTT CTCAGAGGAA E S P	TAGCGCAGGA ATCGCGTCCT L A Q E	AGCGCAATAT TCGCGTTATA A Q Y	360
361	GTTGCCAGT CAACGGGTCA V A Q	ACGATTGGGG TGCTAACCCC Y D W G	TGATGAGGCG ACTACTCCGC D E A	CTTGCGGTCA GAACGCCAGT L A V	ATACAAACTA TATGTTTGTGAT N T N Y	TGGCGTTTTG ACCGCAAAAC G V L	420
421	TATCAAATCG ATAGTTTAGC Y Q I	TTTTTGGAAC AAAAACCTTG V F G T	CCTGCAAGTA GGACGTTTCT L Q V	TTAGAAAACA AATCTTTTGT L E N	ATACGAAATT TATGCTTTAA N T K F	TGAGCAAGCA ACTCGTTCGT E Q A	480
481	ATTGAAGGCT TAACTTCCGA I E G	TAGATCAATT ATCTAGTTAA L D Q L	GCAGGCTGTA CGTCCGACAT Q A V	TATGAAAAAG ATGCTTTTTT Y E K	CCCTTAAGCA GGGAATTCGT A L K Q	GGAAGCTGAC CCTTCGACTG E A D	540
541	AACGCCAAGC TTGCGGTTTCG N A K	AATTTGCAAA TTAAACGTTT Q F A K	AGCCCATGAA TCGGTACTT A H E	AAAGAAAGCA TTTCTTTCGA K E S	TTATTTATAC AATAAATATG I I Y T	CATGGCAAGC GTACCGTTTCG M A S	600
601	GGTGCAAAC CCACGTTTGA G A N	ACGGTGTTCG TGCCACAGCG Y G V A	TTACTCCTAC AARGAGGATG Y S Y	AGCATCTGCA TCGTAGACGT S I C	TTCTCATGGA AAGAGTACCT I L M E	AATGCAATGG TTACGTTACC M Q W	660
661	ATTCATTCCC TAAGTAAGGG I H S	ACGCCATTCA TGCGGTAAGT H A I H	TGCCGGAGAA ACGGCCTCTT A G E	TATTTTCACG ATAAAAGTGC Y F H	GACCGTTTGA CTGGCAAAC G P F E	AATTATTGAT TTAATAACTA I I D	720

721	<u>GAATCCGTGC</u>	<u>CGTTTATCAT</u>	<u>CCTGCTCGGT</u>	<u>TTAGATGAAA</u>	<u>CAAGACCTCT</u>	<u>TGAAGAGCGG</u>	780
	<u>CTTAGGCACG</u>	<u>GCAAATAGTA</u>	<u>GGACGAGCCA</u>	<u>AATCTACTTT</u>	<u>GTTCTGGAGA</u>	<u>ACTTCTCGCC</u>	
	E S V	P F I I	L L G	L D E	T R P L	E E R	
781	<u>GCGCTTACCT</u>	<u>TCTCGAAAAA</u>	<u>GTATGGCAAA</u>	<u>AAGCTCACTG</u>	<u>TGCTTGATGC</u>	<u>TGCATCTTAC</u>	840
	<u>CGCGAATGGA</u>	<u>AGAGCTTTTT</u>	<u>CATACCGTTT</u>	<u>TTCGAGTGAC</u>	<u>ACGAACTACG</u>	<u>ACGTAGAATG</u>	
	A L T	F S K K	Y G K	K L T	V L D A	A S Y	
						←	
841	<u>GACTTCACTG</u>	<u>CAATTGACGA</u>	<u>TTCAGTTAAA</u>	<u>GGCTATCTTG</u>	<u>CTCCGCTCGT</u>	<u>TCTCAATCGT</u>	900
	<u>CTGAAGTGAC</u>	<u>GTTAACTGCT</u>	<u>AAGTCAATTT</u>	<u>CCGATAGAAC</u>	<u>GAGGCGAGCA</u>	<u>AGAGTTAGCA</u>	
	D F T	A I D D	S V K	G Y L	A P L V	L N R	
901	<u>GTGCTGAGAA</u>	<u>GCTATGCAGA</u>	<u>CGAGCTCGCC</u>	<u>GAGGAAAGAA</u>	<u>ATCATCCTTT</u>	<u>ATCTCATAGA</u>	960
	<u>CACGACTCTT</u>	<u>CGATACGTCT</u>	<u>GCTCGAGCGG</u>	<u>CTCCTTTCTT</u>	<u>TAGTAGGAAA</u>	<u>TAGAGTATCT</u>	
	V L R	S Y A D	E L A	E E R	N H P L	S H R	
961	<u>AGATACATGT</u>	<u>GGAAAGTTGA</u>	<u>GTAT</u>				
	<u>TCTATGTACA</u>	<u>CCTTTCAACT</u>	<u>CATA</u>				
	R Y M	W K V E	Y				

Abbildung 4-3: Nukleotidsequenz des *yurP*-Gens sowie die entsprechende Aminosäure-Sequenz.

Der N-terminale Bereich und die internen Aminosäuresequenzen, die durch Proteinsequenzierung ermittelt wurden, sind fettgedruckt. Die Bereiche, die in Primersequenzen übersetzt wurden, sind unterstrichen. Die Orientierung der Primer wurde durch Pfeile markiert. Die durchgezogenen Pfeile stellen die Primersequenzen dar, welche für die erste PCR benutzt wurden. Die gestrichelten Pfeile kennzeichnen die Primersequenzen, die für die inverse PCR verwendet wurden.

Die erhaltene Sequenz wurde durch eine Datenbank-Recherche in der *Bacillus subtilis* Gensequenz als das Gen *yurP* identifiziert, dessen Funktion noch unbekannt ist. Das *yurP*-Gen ist homolog zum *mocD*-Gen aus *Agrobacterium tumefaciens*. Das MocD-Protein ist am Katabolismus von Mannopinen beteiligt. Seine Funktion ist jedoch noch nicht ganz geklärt (Kim *et al.* 1996b).

4.2 Heterologe Expression von *srfD* und *yurP*

Die Gene *srfD* und *yurP* wurden in die Expressionsvektoren pProEx und pMalTM-c2 kloniert. Mit Hilfe des pProEx-Vektors wurde YurP N-terminal mit sechs Histidinresten markiert. SrfD wurde mittels des pMalTM-c2 an das Maltose-bindende Protein fusioniert. Die so markierten und heterolog exprimierten Proteine wurden durch Affinitätschromatographie aufgereinigt. Anschließend wurde ihr Einfluß auf die *in vitro*-Surfactin-Biosynthese getestet. Das MBP-SrfD-Fusionsprotein wurde außerdem zur Herstellung von SrfD-Antikörpern verwendet.

4.2.1 Herstellung des MBP-SrfD-Plasmids

Das *srfD*-Gen wurde aus der chromosomalen DNA von *B. subtilis* OKB 105 mit den Primern Srf se und Srf rev (s. Tab 2) mit Hilfe von PCR (Temperaturprogramm: 10 min 94°C, 30x [1 min 94°C, 1 min 56°C, 1 min 72°C]) amplifiziert. Das 726 bp große DNA-Fragment wurde an den bei der PCR synthetisierten Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *Bam*HI (Vorwärts-Primer) und *Hind*III (Rückwärts-Primer) geschnitten und mittels präparativer Agarosegelelektrophorese gereinigt (3.2.9.7). Das erhaltene DNA-Fragment wurde in den ebenfalls mit diesen Restriktionsenzymen geschnittenen pMal[™]-c2 Vektor kloniert. Das dabei entstandene Konstrukt wurde als MBP-SrfD-Plasmid bezeichnet.

4.2.2 Überexpression des MBP-SrfD-Fusionsproteins

Die Expression des MBP-SrfD-Fusionsproteins erfolgte durch eine Induktion des Vektors mit IPTG. Das SrfD wurde dabei N-terminal mit dem Maltose-bindenden Protein fusioniert, wodurch eine Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie an einer Amylose-Matrix möglich wurde. Die Zellen wurden mit Hilfe einer French-Press-Zelle (4000 Psi) aufgeschlossen und die Zelltrümmer durch Zentrifugation abgetrennt (30 min, 14000 Upm im GSA-Rotor). Der Überstand wurde auf die Amylose-Säule aufgetragen und so lange gewaschen, bis kein Protein mehr mit dem Bradford-Test nachgewiesen werden konnte. Die Elution des MBP-SrfD-Fusionsproteins erfolgte schließlich durch Zugabe von 10 mM Maltose zum Säulenpuffer. Es wurde mittels SDS-PAGE detektiert (Abb. 4-4) und der Proteingehalt nach Bradford (3.2.6) bestimmt. Es wurde eine hohe Anreicherung des MBP-SrfD-Fusionsproteins erreicht. Seine Molmasse liegt bei etwa 70 kDa. Sie setzt sich aus der Masse des Maltose-bindenden Proteins von 42,7 kDa und der Masse von SrfD von 27,5 kDa zusammen. Die aminoterminalen Sequenzierung ergab für das Fusionsprotein folgende Sequenz:

N-terminale Sequenz	M K T E E G K L V I
---------------------	---------------------

Diese stimmt mit der N-terminalen Sequenz des Maltose-bindenden Proteins überein. Für Funktionsstudien wurde versucht, dieses von SrfD abzuspalten. Zu diesem Zweck befindet sich zwischen beiden Funktionseinheiten eine Erkennungssequenz für eine

Faktor Xa-Spaltung, die jedoch nicht erfolgreich verlief. Daher wurde das Fusionsprotein MBP-SrfD als ganzes für die weiteren Versuche eingesetzt.

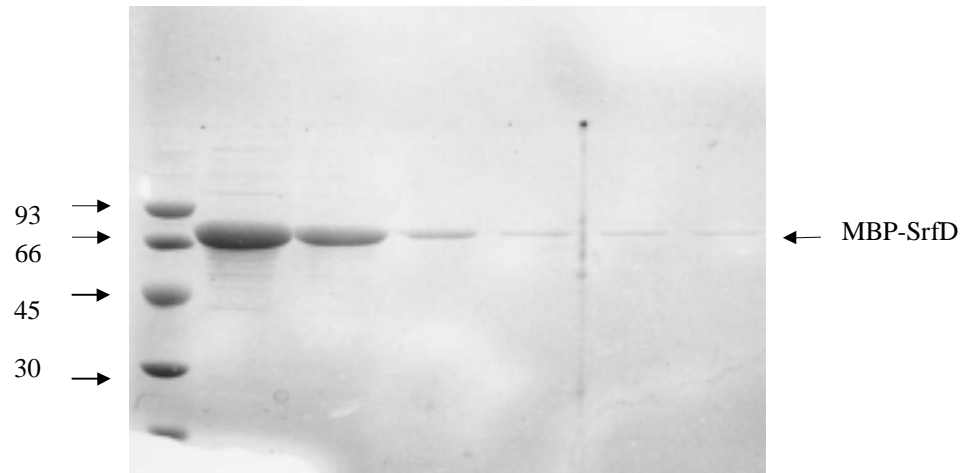


Abbildung 4-4: **SDS-Page des in *E.coli* DH5 α überexprimierten Fusionsproteins MBP-SrfD.**

Spur 1: Molekulargewichtsstandard, Spur 2-7: Fraktionen der Elution des MBP-SrfD mit 10 mM Maltose. Die Färbung der Proteine erfolgte durch Coomassie.

4.2.3 Herstellung des N-His₆-YurP-Plasmids

Aus der chromosomalen DNA von *B. subtilis* OKB 105 wurde das Gen *yurP* mit den Primern Yur se und Yur rev (s Tab 2) mit Hilfe von PCR amplifiziert (Temperaturprogramm: 10 min 94°C, 30x [1 min 94°C, 1 min 58°C, 1 min 72°C]). Die DNA Synthese lieferte ein 984 bp großes Fragment. An dessen Enden wurden mit Hilfe der PCR Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme *EcoRI* (Vorwärts-Primer) und *XhoI* (Rückwärts-Primer) synthetisiert. Das DNA-Fragment wurde in den pProEx-Vektor kloniert. Das resultierende Konstrukt wurde als N-His₆-YurP-Plasmid bezeichnet.

4.2.3.1 Überexpression von N-His₆-YurP

Das N-His₆-YurP wurde durch eine IPTG induzierte Expression des Vektors in *E.coli* DH5 α exprimiert. Hierbei wurden sechs Histidinreste N-terminal an YurP gekoppelt. Diese besitzen eine hohe Affinität zu zweiwertigen Metallionen, wie z. B. Ni²⁺, so daß das His₆-markierte Protein aus dem Rohextrakt von *E. coli* DH5 α durch Affinitätschromatographie an einer Nickelchelate-Matrix (NI-NTA) gereinigt werden

konnte. Das N-His₆-YurP wurde durch stringente Waschschriffe mit Imidazol (30 mM) von unspezifisch gebundenen Proteinen getrennt. Anschließend wurde das N-His₆-YurP mit 120 mM Imidazol eluiert, aufkonzentriert und seine Molmasse durch SDS-PAGE bestimmt (Abb. 4-10). Sie betrug ca. 36 kDa.

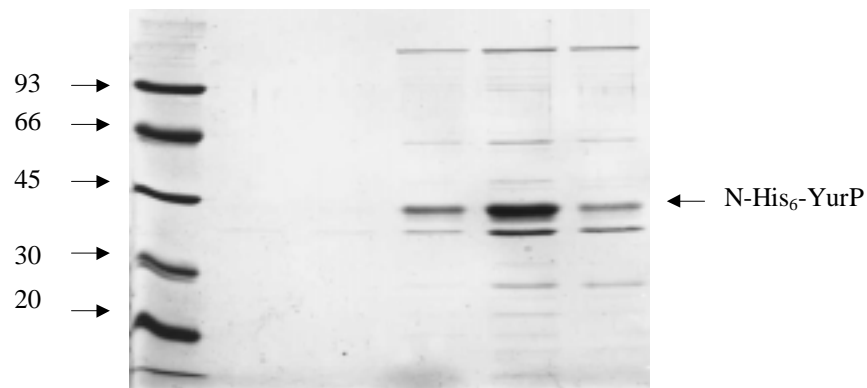


Abbildung 4-5: SDS-PAGE des in *E. coli* DH5 α exprimierten N-His₆-YurP-Proteins.

Spur 1 Protein-Größenstandard, Spur 2 und 3 Waschdurchlauf, Spur 4-6 N-His₆-YurP-Proteinhaltige Fraktionen nach der Elution mit 120 mM Imidazol. Die Proteinfärbung erfolgte durch Coomassie.

In der Abbildung 4-5 ist das N-His₆-YurP mit einem Pfeil markiert. Die N-His₆-YurP haltigen Fraktionen wurden vereinigt. N-His₆-YurP wurde auf dieser Reinigungsstufe für die weiteren Tests eingesetzt.

4.3 Detektion der Surfactin-Synthetase-Teilenzyme

Die Fraktionierung der Surfactin-Synthetase-Teilenzyme SrfA, SrfB und SrfC aus *B. subtilis* OKB 105 erfolgte mit Hilfe von Aca34-Gelfiltration in der unter 3.2.3 beschriebenen Weise. Sie wurden durch kovalenten Thioestereinbau von L-[¹⁴C]Leu (3.2.4.2) bzw. durch SDS-PAGE (s. 3.2.7) detektiert. SrfA und SrfB eluieren gemeinsam bei der Aca34-Gelfiltration und bilden die E1-Fraktion, die die Teilenzyme E1A (SrfA) und E1B (SrfB), enthält. SrfC eluiert bei einem höherem Volumen. Es entspricht E2. E1A und E1B erscheinen bei der SDS-PAGE als eng beieinander liegende Proteinbanden. Der niedermolekulare Bereich (E3) der Aca34-Gelfiltration wurden auf seine katalytische Aktivität in der *in vitro*-Surfactin-Biosynthese getestet. Hierfür wurden

die Teilenzyme SrfA, SrfB und SrfC mit den bei der AcA34-Gelfiltration erhaltenen E3-haltigen Fraktionen komplementiert .

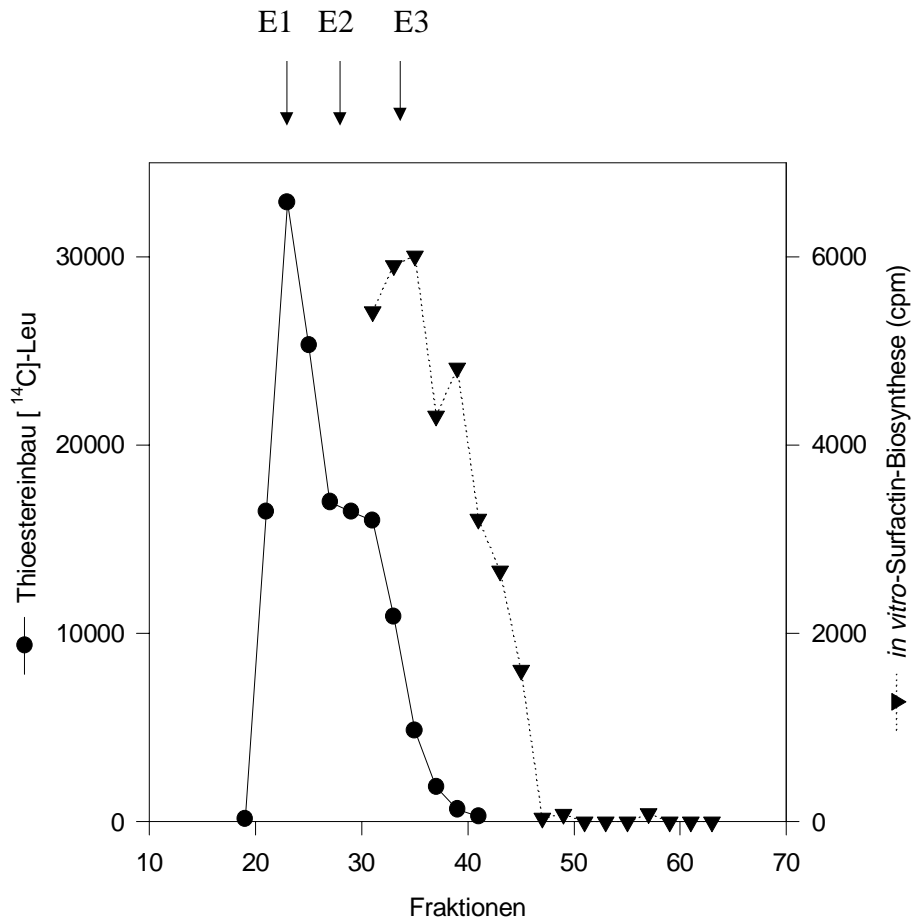


Abbildung 4-6: **Gelfiltration eines zellfreien Rohextraktes aus *B. subtilis* OKB 105 an Ultrogel AcA 34**
 Die Proteine wurden, wie unter 3.2.3 beschrieben, aufgetrennt. Die Surfactin Synthetase-Teilenzyme E1A, E1B und E2 wurden in den erhaltenen Fraktionen durch kovalenten Thioestereinbau von L-[¹⁴C]Leu lokalisiert (s. 3.2.4.2). E3 wurde mit Hilfe von Surfactin-Biosynthese mit L-[¹⁴C]Leu als Tracer detektiert.

In Abbildung 4-6 ist das Elutionsprofil der Surfactin-Synthetase-Teilenzyme dargestellt. E1 und E2 wurden durch L-[¹⁴C]Leu Thioestereinbau detektiert. Der höchste Einbau wurde in der Fraktion 23 gefunden. E1A und E1B (SrfA und SrfB) können durch AcA34-Gelfiltration nicht getrennt werden, weil sie nahe am Ausschlußvolumen eluieren. E1A und E1B erscheinen in der in Abbildung 4-7 A dargestellten SDS-PAGE als Doppelbande, E2 (SrfC) beobachtet man bei einem etwas höheren Elutionsvolumen. Es erscheint als Schulter des L-[¹⁴C]-Leu Thioestereinbaus von E1A und E1B.

Die Detektion der für die Surfactin-Biosynthese notwendigen E3-Fractionen erfolgte mit Hilfe des unter 3.2.4.3 beschriebenen *in vitro*-Surfactin-Biosynthese-Tests. Zu diesem Zweck wurden SrfA (E1A), SrfB (E1B) und SrfC (E2) mit den E3-Fractionen komplementiert. In Abbildung 4-6 ist das Elutionsprofil der *in vitro*-Surfactin-Biosynthese dargestellt. Die höchste Surfactinsynthese wurde in Fraktion 35 beobachtet. Ferner wurde versucht, SrfD nach AcA34-Gelfiltration immunchemisch nachzuweisen. Dazu wurden die in den einzelnen Fraktionen enthaltenen Proteine gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet.

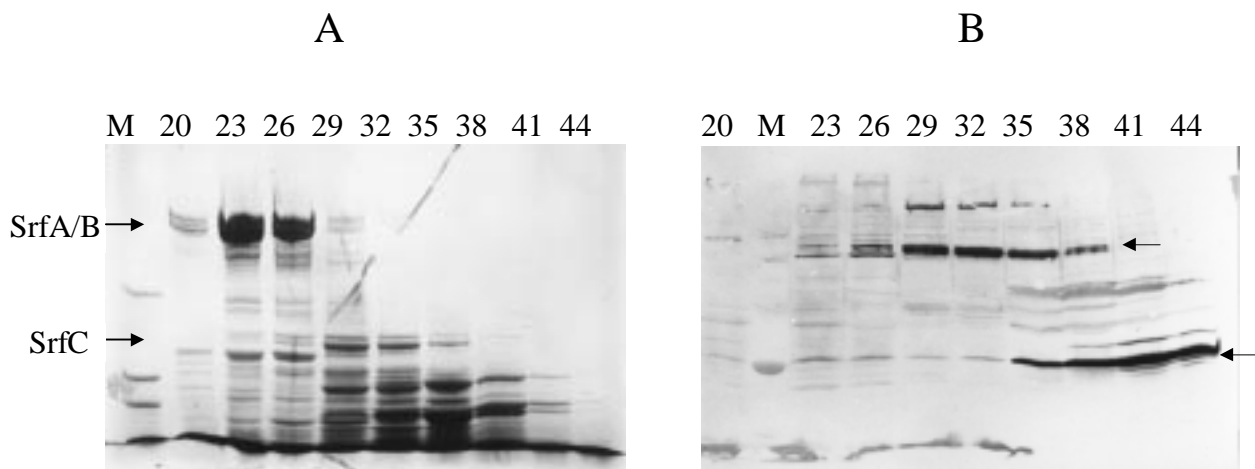


Abbildung 4-7: SDS-Page der durch AcA34-Gelfiltration fraktionierten Proteine des zellfreien Rohextraktes von *B. subtilis* OKB 105

Die Proteine in den einzelnen Fraktionen der Abbildung 4-6 dargestellten AcA34-Gelfiltration wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF Membran geblottet. A) Die Positionen der Enzyme SrfA, SrfB und SrfC sind durch Pfeile markiert. B) Die auf die PVDF Membran geblotteten Proteine wurden auf eine Reaktion mit dem anti-MBP-SrfD-Antikörper untersucht. Dieser wurde in einer Verdünnung von 1:40000 eingesetzt.

Es fand in zwei Bereichen (durch Pfeile gekennzeichnet) eine Reaktion mit dem MBP-SrfD-Antikörper statt und zwar wurde die Immunantwort bei einem Protein mit einer Molmasse von ca. 30 kDa bzw. ca. 60 kDa beobachtet. Die Immunantwort bei 30 kDa beobachtet man über den gesamten Fraktionsbereich. Sie ist ab Fraktion 35 besonders deutlich. Die Immunantwort des 60 kDa Proteins beobachtet man im Fraktionsbereich von 23-38. Dies deutet auf unterschiedliche Formen von SrfD hin, die sehr wahrscheinlich seiner monomeren bzw. dimeren Form entsprechen.

4.4 Identifizierung von SrfD in den E3-Fractionen mit dem MBP-SrfD-Antikörper

Es wurde außerdem versucht, freies SrfD mit Hilfe des MBP-SrfD-Antikörpers im niedermolekularen Bereich der AcA34-Gelfiltration nachzuweisen. Die Funktion von SrfD wurde bisher noch nicht geklärt. Es wird vermutet, daß es an der Termination bzw. Zyklisierung der Surfactin-Biosynthese beteiligt sein könnte (Schneider und Marahiel 1998). Schneider und Marahiel diskutieren, daß die Funktion des SrfD möglicherweise eine Korrekturfunktion bei Fehlbeladung der Thioesterreaktionszentren ausübt. Dies wird durch Ergebnisse bei der Synthese des Polyketids Tylosin unterstützt, die darauf hindeuten, daß die externe Thioesterase Tylo sehr wahrscheinlich für die Abspaltung von falschen gebundenen Precursoren verantwortlich ist (Butler *et al.* 1999)

Es wurden die E3-haltigen Fraktionen wie unter 3.2.4.3 beschrieben, auf Surfactin-Biosynthese untersucht. Das Ergebnis ist in Abbildung 4-8 dargestellt.

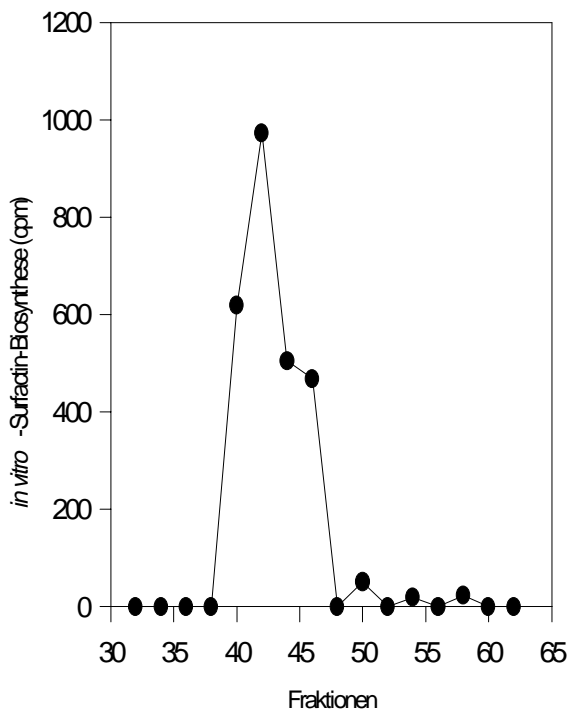


Abbildung 4-8: Lokalisierung von E3 nach AcA34-Gelfiltration.

E3-Fractionen wurde mit den Teilenzymen SrfA, SrfB und SrfC der AcA34-Gelfiltration komplementiert und auf die Stimulierung der *in vitro*-Surfactin-Biosynthese untersucht. Die Produkte wurden mit 5 %iger TCA gefällt, an Membranfilter adsorbiert und ihre Radioaktivität durch Flüssigszintillationszählung gemessen. Die Versuche wurden, wie unter 3.2.4.3 beschrieben, durchgeführt.

Surfactin-Biosynthese wurde in den Fraktionen 40-46 nachgewiesen. Zum Nachweis von SrfD wurden die in den Fraktionen 38-54, der AcA34-Gelfiltration erhaltenen Proteine gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran geblottet und SrfD

immunchemisch mit dem MBP-SrfD-Antikörper nachgewiesen. Das Ergebnis ist in Abbildung 4-9 dargestellt.

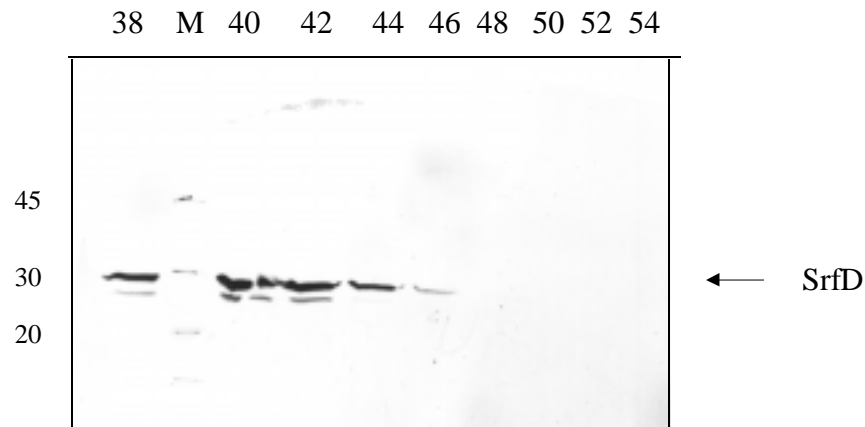


Abbildung 4-9: **Immunchemischer Nachweis von SrfD mit dem MBP-SrfD-Antikörper in den E3-haltigen Fraktionen nach AcA34-Gelfiltration eines zellfreien Rohextrakts von *B. subtilis* OKB 105.**

Es wurden die Proteine in den Fraktionen 38-54 der AcA34-Gelfiltration in Abb. 4-8 von jeder zweiten Fraktion gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine PVDF Membran gebロットet und auf eine Reaktion mit dem MBP-SrfD-Antikörper getestet. Dieser wurde in einer Verdünnung von 1:40000 eingesetzt. Spur 2: Molekulargewichtsstandard.

Hierbei wurde in den Fraktionen 38-46 eine Immunantwort des MBP-SrfD-Antikörpers mit zwei Proteinen nachgewiesen, in denen auch *in vitro*-Surfactin-Biosynthese beobachtet wurde. Durch SDS-PAGE wurde ermittelt, daß diese beiden Proteine Molmassen im Bereich von ca. 30 kDa aufweisen.

Das Protein mit der stärkeren Immunantwort (obere Bande) wurde N-terminal ansequenziert. Es wurde folgende Sequenz ermittelt.

N-terminale Sequenz	L F K S F D
---------------------	-------------

Die aus der Gensequenz ermittelte N-terminale Sequenz von SrfD lautet :

M S Q L F K S F D A S E

Der unterstrichene Bereich dieser Sequenz stimmt ab Position vier mit der N-terminalen Proteinsequenz von SrfD überein. Die ersten drei Aminosäuren konnten nicht ermittelt werden. Zur weiteren Aufreinigung von SrfD wurden die Fraktionen 38-47 der AcA34-Gelfiltration vereinigt und durch hochauflösende Anionenaustauscherchromatographie an

Pharmacia MonoQ HR 5/5 weiter gereinigt (s. 3.2.3.5). Die erhaltenen Fraktionen wurden auf *in vitro*-Surfactin-Biosynthese getestet (Abb. 4-10).

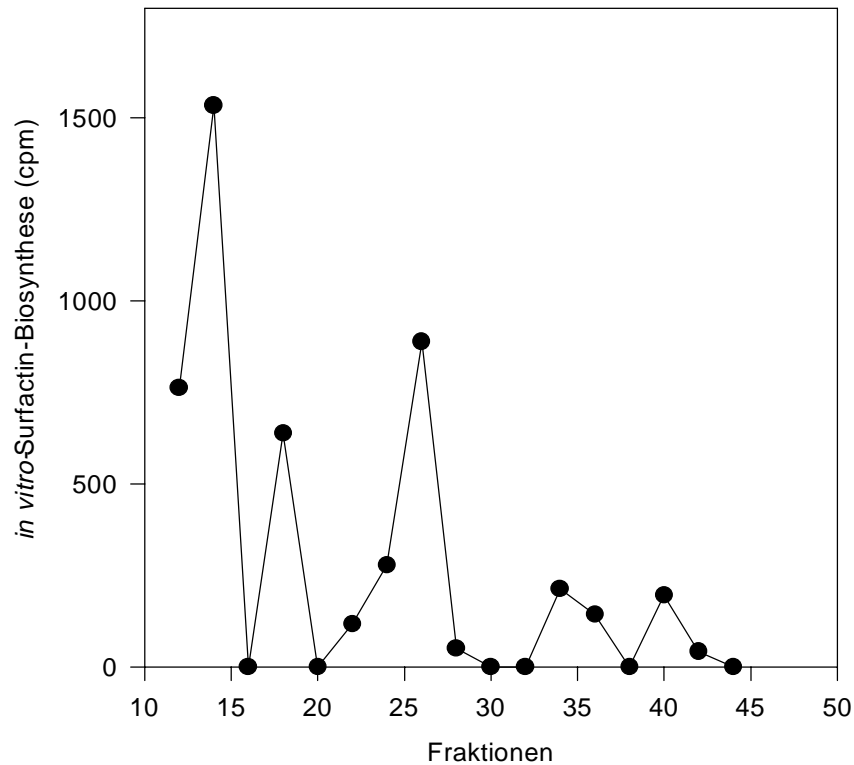


Abbildung 4-10: **Hochauflösende Anionenaustauscherchromatographie der SrfD-haltigen Fraktionen der AcA34-Gelfiltration an MonoQ HR 5/5.**

Die erhaltenen MonoQ-Fraktionen wurden mit den SrfA-, SrfB- und SrfC-Fraktionen der AcA34-Gelfiltration komplementiert und auf *in vitro*-Surfactin-Biosynthese getestet. Das gebildete Surfactin wurde mit 5 %iger TCA gefällt, an Membranfilter adsorbiert und anschließend durch Flüssigszintillationszählung gemessen.

Es ergab sich eine Aufspaltung der nach AcA34-Gelfiltration erhaltenen E3-Fraktionen (Abb. 4-10) in drei *in vitro*-Surfactin-Biosynthese-aktive Bereiche. Die in diesen Fraktionen enthaltenen Proteine wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und geblottet. SrfD wurde wiederum immunchemisch mit dem MBP-SrfD-Antikörper nachgewiesen. Das Ergebnis ist in Abbildung 4-11 dargestellt.

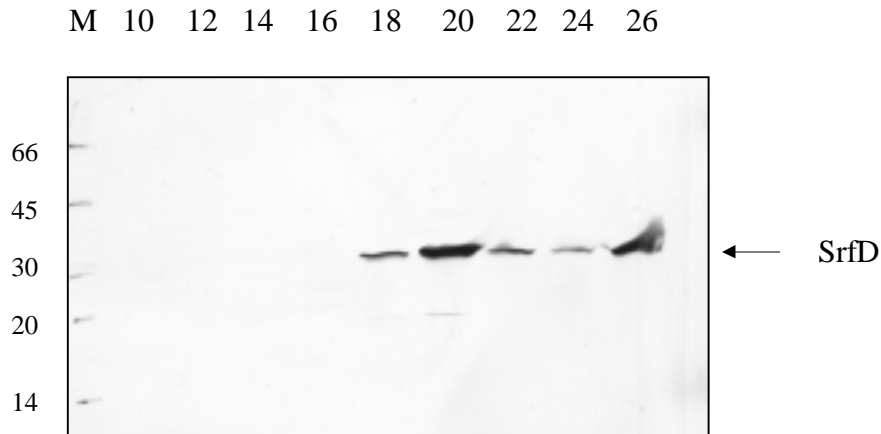


Abbildung 4-11: **Immunchemischer Nachweis von SrfD in den durch hochauflösende Anionenaustauscherchromatographie an MonoQ HR 5/5 erhaltenen Fraktionen**

Es wurden jeweils 20 µl Aliquots der MonoQ-Fraktionen (s. Abb. 4-10), in denen *in vitro*-Surfactin-Biosynthese beobachtet wurde, gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. SrfD wurde mit Hilfe des MBP-SrfD-Antikörpers immunchemisch nachgewiesen.

M = Molekulargewichtsstandard. Der MBP-SrfD-Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:40000 eingesetzt.

SrfD wurde immunchemisch in den Fraktionen 18-26 nachgewiesen (s. Abb. 4-11). Die N-terminale Sequenzierung ergab eine Übereinstimmung mit der bekannten Proteinsequenz. In diesem Fall korrelierte die Immunantwort von SrfD nicht mit der höchsten Surfactin-Biosynthese-Aktivierung, sondern konnte erst im drittem Aktivierungs-Maximum nachgewiesen werden (s. 4-10).

4.5 Kinetik der *in vitro*-Surfactin-Biosynthese

In den Arbeiten von C. Ullrich und M. Menkhaus *et al.* wurde für die Initiation der Surfactin Biosynthese die Beteiligung einer Acyltransferase postuliert. Sie zeigten, daß die *in vitro*-Surfactin-Biosynthese von einer niedermolekularen E3-Fraktion abhängig war (C. Ullrich, 1991, Menkhaus *et al.* 1993). Hierbei fungiert 3-Hydroxytetradecanoyl-Coenzym A als Fettsäuresubstrat (Ullrich *et al.* 1991). In der hier vorliegenden Arbeit wurde durch kinetische Untersuchungen überprüft, ob die Surfactin-Synthetase-Teilenzyme SrfA, SrfB und SrfC in der Lage sind, die *in vitro*-Surfactin-Biosynthese in Abwesenheit von E3 zu katalysieren. In Abbildung 4-12 ist dieser Prozeß in Abhängigkeit von der Zeit mit (●) und ohne (▼) β-HA-CoA in Gegenwart (●) bzw. Abwesenheit (■) von DTE dargestellt.

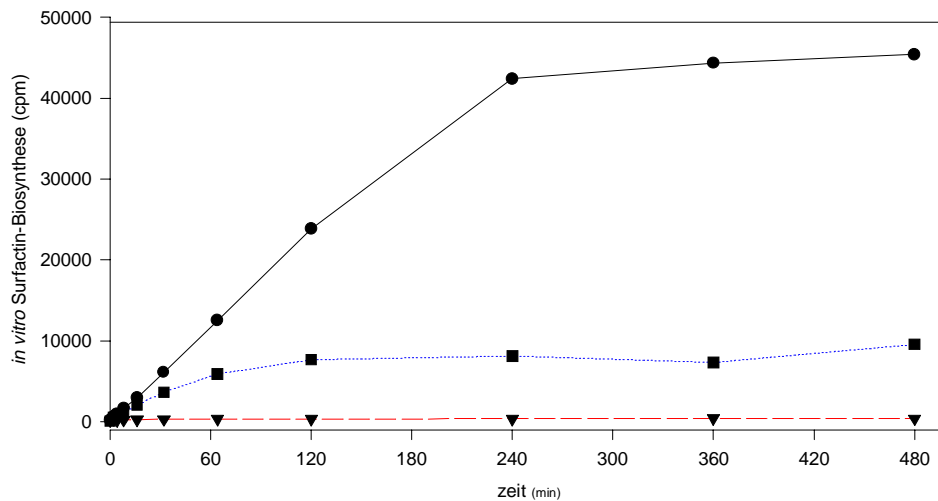


Abbildung 4-12: **Kinetik der *in vitro*-Surfactin-Biosynthese.**

Es wurden die Surfactin-Synthetase-Teilenzyme, SrfA, SrfB und SrfC nach AcA34-Gelfiltration in Anwesenheit von 5 mM DTE (●) bzw. ohne DTE (■) inkubiert. Als Referenz diente ein Ansatz ohne β -HA-CoA (▼). Die Reaktionsansätze sind unter 3.2.4.3 beschrieben. Die Proben wurden nach verschiedenen Reaktionszeiten mit 5 % iger TCA gefällt, an Membranfilter adsorbiert und durch Flüssigszintillationsmessung gezählt.

Aus der Abbildung 4-12 ist ersichtlich, daß die durch AcA34-Gelfiltration gewonnenen Surfactin-Synthetase-Teilenzyme SrfA-C auch allein zur *in vitro*-Surfactin-Biosynthese befähigt sind. Hierfür wird offensichtlich kein E3-Protein benötigt. Der Vergleich der Surfactinbildung mit und ohne DTE im Reaktionsansatz zeigt, daß die Aktivität der Surfactin-Synthetase-Teilenzyme mit DTE (●) ca. fünfmal höher war als ohne DTE (■). Hierbei wurde der Maximalwert der Surfactin-Biosynthese ohne DTE (■) bereits nach ca. 60 min bzw. mit DTE (●) erst nach ca. 240 min erreicht. Die Surfactin-Synthetase-Teilenzyme sind demnach in Gegenwart eines Reduktionsmittels deutlich aktiver. Die Bildung von Surfactin wurde mittels Dünnschichtchromatographie und anschließendem Radioscanning kontrolliert. Es wurden Aliquots der Surfactin-Biosynthese-Reaktionsansätze mit und ohne β -HA-CoA auf eine Kieselgel 60-Platte aufgetragen. Das Ergebnis ist in Abbildung 4-13 dargestellt.

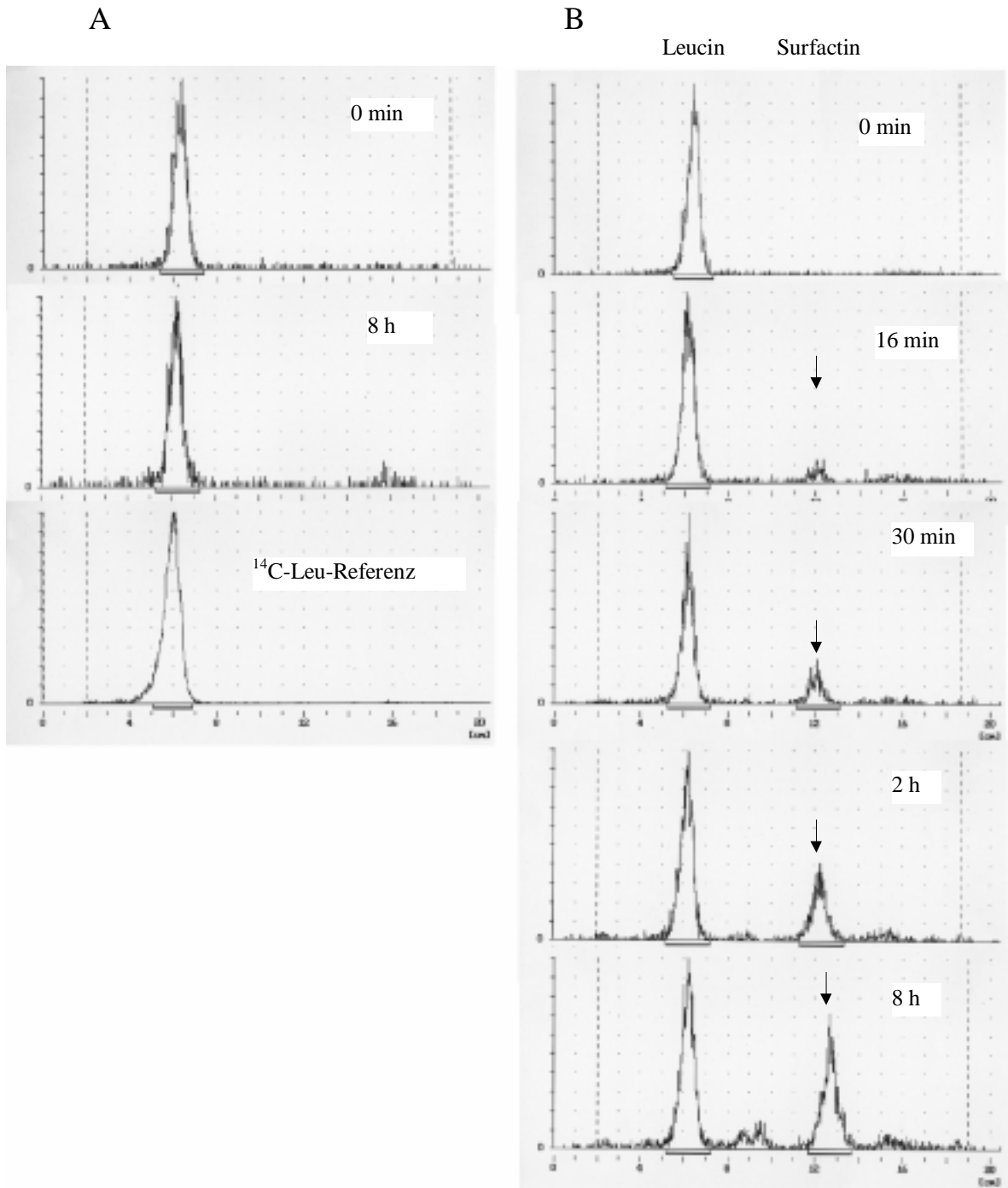


Abbildung 4-13: **Dünnschichtchromatographie und Radioscanning der Bildung von Surfactin.**

Es wurden die Surfactin-Synthetase-Teilenzyme SrfA-C der AcA34-Gelfiltration mit und ohne β -HA-CoA inkubiert. Die erhaltenen Proben wurden mit n-Butanol extrahiert und jeweils 25 μ l auf eine Kieselgel 60-Platte aufgetragen. Als Laufmittel wurde Chloroform:Methanol:Wasser (65:25:4 v/v/v) verwendet. Die mit [¹⁴C]-Leu markierten Produkte wurden mittels Radioscanning detektiert. A) ohne β -HA-CoA B) mit β -HA-CoA. Die Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen. Die Position von Surfactin ist durch einen Pfeil markiert.

Aus Abbildung 4-13 B ist ersichtlich, daß Surfactin von SrfA, SrfB und SrfC auch ohne Beteiligung der postulierten Acyltransferase E3 synthetisiert werden kann.

Um auszuschliessen, daß diese Effekte durch eine mit den durch AcA34-Gelfiltration getrennten Surfactin-Synthetase-Teilenzymen assoziierte Acyltransferase hervorgerufen werden, wurden diese durch hochauflösende Anionenaustauscherchromatographie an MonoQ HR 5/5 weiter gereinigt (3.2.3.5) und auf Surfactin-Biosynthese getestet. Zum Vergleich wurden Surfactin-Biosynthese-Messungen in Gegenwart von E3 durchgeführt. Die gebildeten Produkte wurden dünnschichtchromatographisch getrennt und durch Autoradiographie nachgewiesen (3.2.5.1). Surfactin wurde mit Hilfe von MALDI-MS identifiziert (3.2.5.2). Die erhaltenen Ergebnisse sind in den Abbildungen. 4-14 und 4-15 dargestellt.

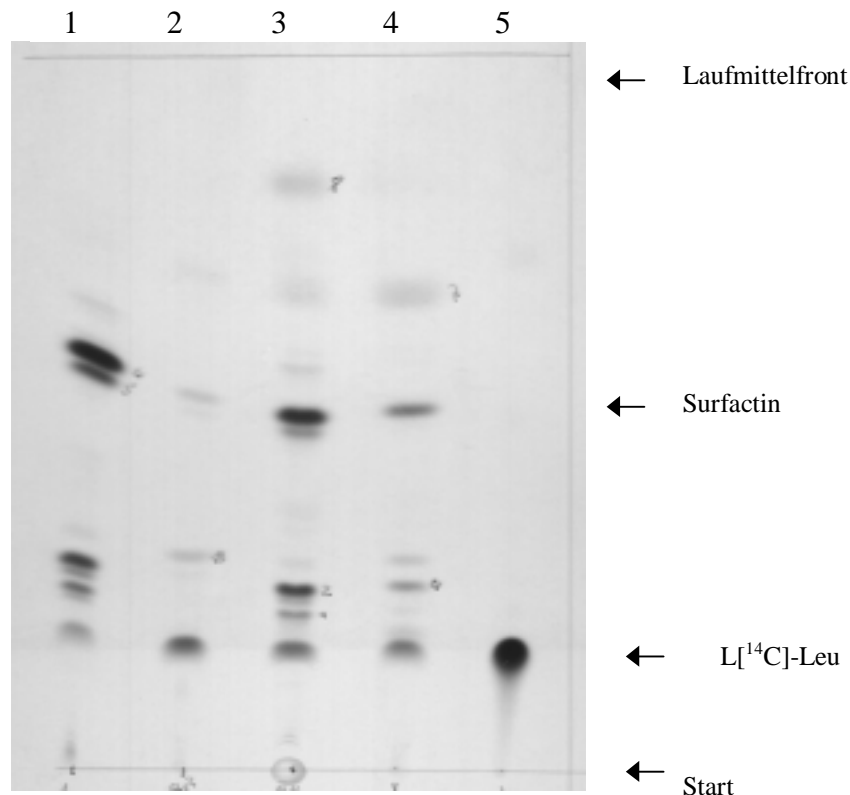


Abbildung 4-14: Dünnschichtchromatographische Trennung der mit L¹⁴C]-Leu markierten Produkte bei der *in vitro*-Surfactin-Biosynthese

Es wurden die durch AcA34-Gelfiltration und hochauflösende Anionenaustauscherchromatographie gereinigten Surfactin-Synthetase-Teilenzyme SrfA, SrfB und SrfC mit und ohne eine E3-Fraktion der AcA34-Gelfiltration inkubiert und die *in vitro*-Surfactin -Biosynthese gemessen. Die Ansätze wurden über Nacht inkubiert und anschließend mit n-Butanol extrahiert. Es wurden jeweils Aliquots von 25 µl auf eine Kieselgel 60-Platte aufgetragen. Als Laufmittel wurde Chloroform:Methanol:Wasser (65:25:4 v/v/v) verwendet. Die mit L¹⁴C]-Leu markierten Produkte wurden mittels Autoradiographie detektiert.

Spur 1: SrfA-C nach AcA34-Gelfiltration ohne E3, Spur 2: SrfA-C nach hochauflösender Anionenaustauscherchromatographie an MonoQ HR 5/5 ohne E3, Spur 3: SrfA-C nach AcA34-Gelfiltration mit E3, Spur 4: SrfA-C nach Anionenaustauscherchromatographie MonoQ HR 5/5 mit E3 und Spur 5: L¹⁴C]-Leu als Referenz.

Es konnte in allen Biosyntheseansätzen Surfactin nachgewiesen werden (Pfeil). In den durch hochauflösende Anionenaustauscherchromatographie erhaltenen Fraktionen wurde durch Zugabe von E3 mehr Surfactin nachgewiesen als ohne E3 (Spur 2 und 4). In den durch AcA34-Gelfiltration erhaltenen Fraktionen konnte unter diesen Bedingungen kein Unterschied festgestellt werden (Spur 1 und 3).

Für den massenspektrometrischen Surfactinnachweis wurden die Proben nach 60 min bzw. 8 h mit n-Butanol extrahiert und anschließend durch MALDI-MS analysiert. Als Referenz diente ein Ansatz ohne β -HA-CoA. Die gewonnenen Ergebnisse sind in Abbildung 4-15 dargestellt.

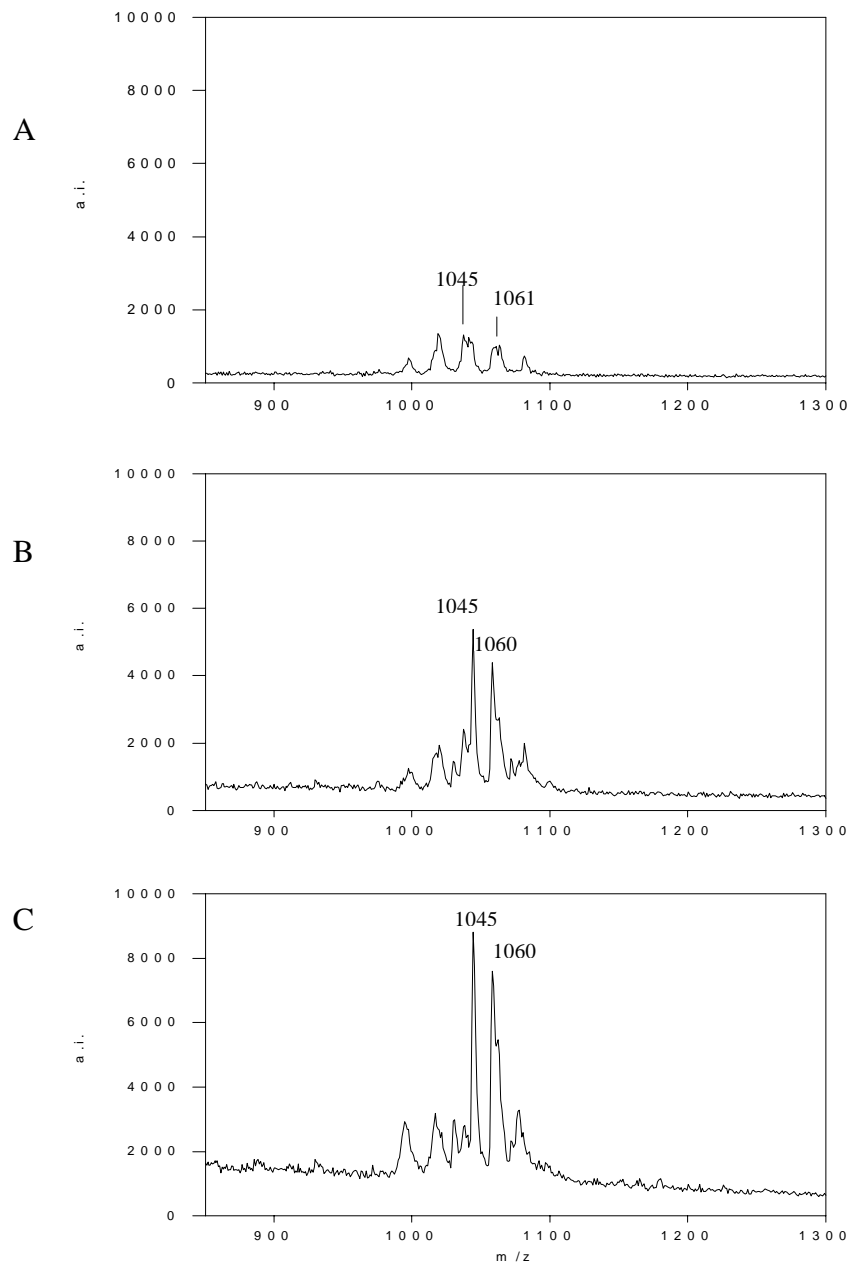


Abbildung 4-15: Nachweis von Surfactin mit Hilfe von MALDI-MS

Es wurden in einem Surfactin-Biosynthesetest die Teilenzyme SrfA-C 60 min (B) und 8 h (C) inkubiert. Zur Kontrolle wurden diese ohne Fettsäuresubstrat inkubiert (A). Die Ansätze wurden mit n-Butanol extrahiert. Die Spektren wurden mit einem Bruker-Reflex MALDI-TOF-Massenspektrometer aufgenommen.

MALDI-Massenspektren wurden im Bereich von m/z-Werten zwischen 850 und 1300 aufgenommen. Diese sind in Abbildung 4-15 dargestellt. Es wurden Signale bei m/z-

Werten von 1045-1060 gemessen, die den Massen verschiedener Surfactin-Isoformen entsprechen. Es wurden auch in der Kontrolle geringe Mengen Surfactin nachgewiesen, das sehr wahrscheinlich mit den Synthetaseenzymen assoziiert war.

4.5.1 Untersuchung des Einflusses von MBP-SrfD-Fusionsprotein, N-His₆-YurP und E3 auf die *in vitro*-Surfactin-Biosynthese

In der Arbeit von M. Menkhaus (Menkhaus 1995) wurde postuliert, daß für die Surfactin-Biosynthese eine Acyltransferase E3 erforderlich ist. Im Folgenden wurde der Einfluß des MBP-SrfD-Fusionproteins, sowie von N-His₆-YurP im Vergleich zu einer E3-Fraktion auf die Kinetik der Surfactin-Biosynthese untersucht. Das gentechnisch hergestellte N-His₆-YurP-Protein wurde untersucht, weil es von M. Menkhaus in den E3-Fraktionen gefunden und als Acyltransferase postuliert wurde (Menkhaus 1995). MBP-SrfD wurde eingesetzt, weil in den E3-Fraktionen SrfD nachgewiesen wurde (s. 4.4) und man vermutet, daß es an der Zyklisierung von Surfactin beteiligt ist. Durch das gentechnisch hergestellte MBP-SrfD sollte versucht werden die Funktion von SrfD zu ermitteln. Hierbei wurden die unter 3.2.4.3 beschriebenen Reaktionsbedingungen gewählt. Die Reaktionsmischungen enthielten die Surfactin-Synthetase-Teilenzyme SrfA, SrfB und SrfC. Diese wurden jeweils mit einem der zu testenden Proteine komplementiert. Als Kontrolle diente ein Ansatz ohne β -HA-CoA-Fettsäuresubstrat. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Abb. 4-16 dargestellt.

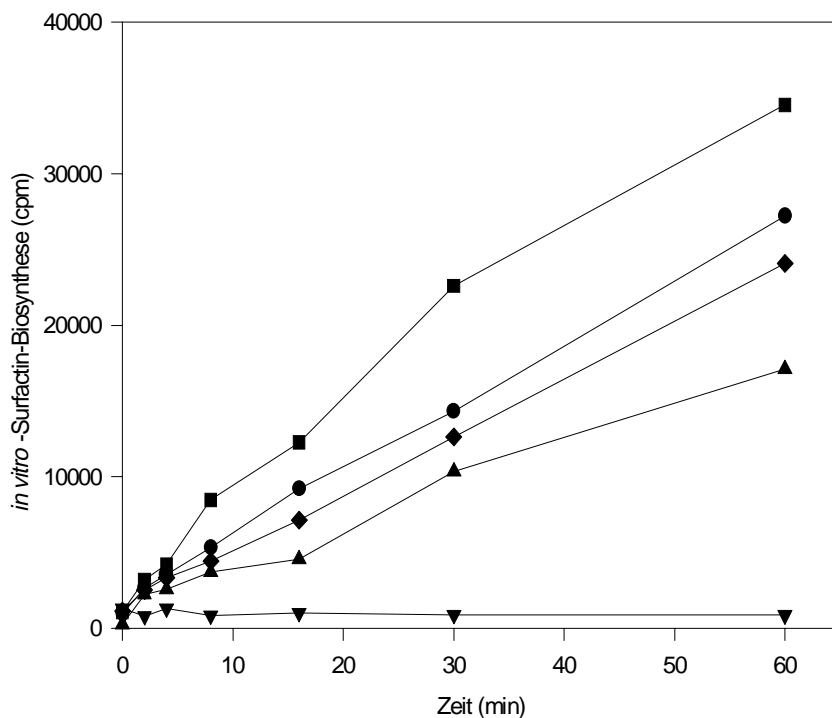


Abbildung 4-16: **Untersuchung des Einflusses von E3, MBP-SrfD und N-His₆-YurP auf die *in vitro*-Surfactin-Biosynthese.**

Dargestellt ist die Kinetik der Surfactinbildung. Die Reaktionsmischungen enthielten die durch Aca34-Gelfiltration aufgetrennten Teilenzyme SrfA, SrfB und SrfC sowie das jeweils zu testende Protein. Reaktionsansatz mit β -HA-CoA (●), mit der E3-Fraktion (■), mit MBP-SrfD-Fusionsprotein (▲), mit N-His₆-YurP (◆) und ohne β -HA-CoA (▼). Die erhaltenen Produkte wurden nach verschiedenen Zeitpunkten mit 5 % iger TCA gefällt, an Membranfilter adsorbiert und ihre Radioaktivität durch Flüssigszintillationszählung bestimmt.

Die untersuchten Proteine beeinflussen die *in vitro*-Surfactin-Biosynthese auf unterschiedliche Weise. Die in Abbildung 4-16 dargestellte Kinetik zeigt die stimulierende Wirkung von E3 (■) auf die *in vitro*-Surfactin-Biosynthese. Im Gegensatz hierzu wurden inhibitorische Effekte in Gegenwart von MBP-SrfD und N-His₆-YurP auf die Surfactin-Bildung beobachtet.

4.6 Untersuchung der Initiation der *in vitro*-Surfactin-Biosynthese

Da bei den bisher beschriebenen Surfactin-Biosynthese-Experimenten die Gegenwart einer Acyltransferase in den Präparationen der Surfactin-Synthetase-Teilenzymen SrfA, SrfB und SrfC nicht ganz ausgeschlossen werden konnte, wurde anstelle des Gesamtprozesses die Initiation der Surfactin-Biosynthese untersucht. Zu diesem Zweck wurden das heterolog exprimierte Glutaminsäure-aktivierende Modul Glu-6-His und die davon abgeleiteten Mutanten Glu-6-A₁₃₉A₁₄₀-6-His und Glu-Δ-6-His gentechnisch hergestellt und für die Untersuchungen der Initiation der *in vitro*-Surfactin-Biosynthese eingesetzt. Diese Reaktion wurde, wie unter 3.2.4.4 beschrieben, durchgeführt. Hierbei wurden die Reaktionsprodukte zwischen β-HA-CoA und Glutaminsäure detektiert.

4.6.1 Expression des C-His₆-markierten Glutaminsäure-aktivierenden Moduls und der entsprechenden Mutanten

Die Plasmide zur Expression des His-markierten Glu-aktivierenden Moduls und entsprechenden Mutanten wurden von F. Bernhardt, Institut für Kristallographie an der Freien Universität Berlin, zur Verfügung gestellt. Hierbei wurden durch eine IPTG induzierte Expression des jeweiligen Plasmids in *E. coli* DH5α, sechs Histidinreste an das C-terminale Ende dieser Proteine fusioniert. Ihre Aufreinigung erfolgte durch eine Affinitätschromatographie an einer Ni-NTA-Matrix (s. 3.2.11). Das in den Initiationsversuchen verwendete Glu-aktivierende Modul und seine Mutanten sind in der Abbildung 4-17 schematisch dargestellt.

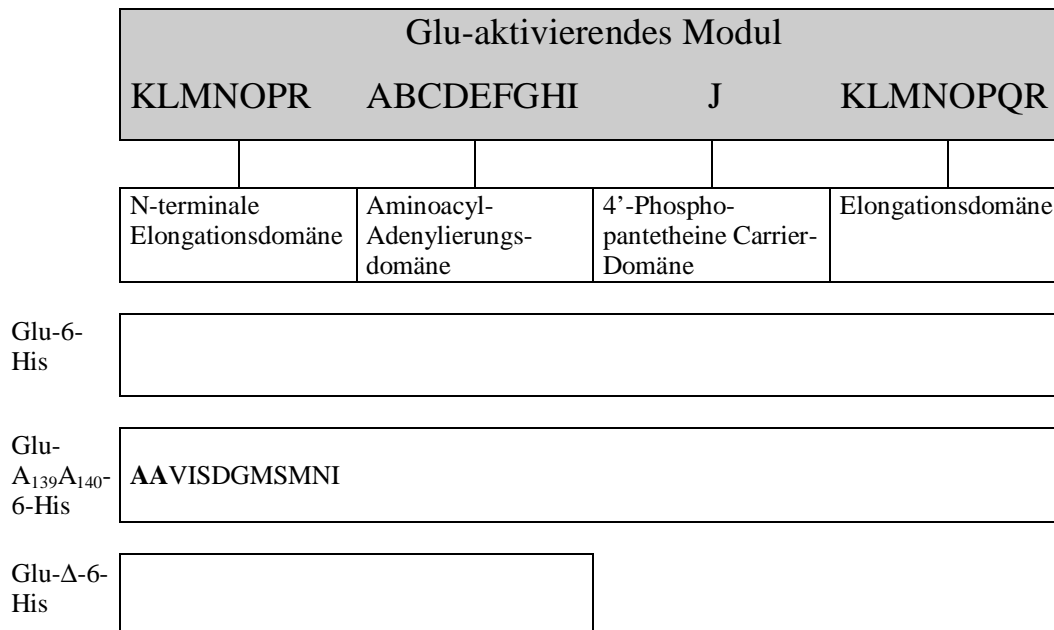


Abbildung 4-17: **Schematische Darstellung des in den Initiationsversuchen verwendeten Glu-aktivierenden Moduls und der entsprechenden Mutanten.**

Die konservierten Motive funktioneller Domänen des Glu-aktivierenden Moduls sind durch Großbuchstaben gekennzeichnet. Unterhalb der konservierten Motive sind die entsprechenden Domänen dargestellt, deren Größenverhältnis zueinander nicht berücksichtigt wurde. Die darunter gezeichneten offenen Balken kennzeichnen den Umfang der drei Konstrukte des Glu-aktivierenden Moduls. Glu-6-His umfaßt das gesamte Modul. Die in der Mutante Glu-A₁₃₉A₁₄₀-6-His substituierten Histidinreste in den Positionen 139 und 140 sind in der Konsensussequenz des M-Motivs der N-terminalen Elongationsdomäne durch fettgedruckte Buchstaben gekennzeichnet. Glu-Δ-6-His ist vor dem Thiolierungsmotiv J deletiert.

Das erste Konstrukt umfaßt das vollständige Glu-aktivierende Modul (Glu-6-His), von der N-terminalen Elongationsdomäne (K-Motiv) bis zum R-Motiv der sich anschließenden C-terminalen Elongationsdomäne. In der Mutante Glu-A₁₃₉A₁₄₀-6-His wurden die konservierten Histidinreste in den Positionen 139 und 140 des M-Motivs in der N-terminalen Elongationsdomäne durch Alanin substituiert. Im Fall der dritten Mutante Glu-Δ-6-His wurde das Glu-aktivierende Modul vor dem Thiolierungs-Motiv J nach der Aminosäure an Position 966 deletiert, so daß hier die Thiolierungs- und die C-terminale Elongationsdomäne fehlen.

Die drei Konstrukte wurden aus Rohextrakten von *E. coli* DH5α durch Affinitätschromatographie an einer Ni-NTA-Matrix aufgereinigt. Der auf die Ni-NTA-Säule aufgetragene Rohextrakt wurde durch einen stringenten Waschschrift (30 mM Imidazol) von unspezifisch gebundenen Proteinen befreit. Die Elution der Konstrukte erfolgte mit 120 mM Imidazol. Sie wurden mittels SDS-PAGE untersucht und N-terminal

ansequenziert. Die N-terminale Sequenzierung zeigte bei allen drei Fusionsproteinen die folgende Sequenz:

N-terminale Sequenz	MEITFYPLT
---------------------	-----------

Diese stimmt mit dem bekannten N-Terminus für das erste Modul des *srfA*-Operons überein. Die erhaltenen Proteine wurden auf dieser Reinigungsstufe in die weiteren Versuche eingesetzt.

4.6.2 Funktionsuntersuchungen des Glutaminsäure-aktivierenden Moduls Glu-6-His und der Mutanten Glu-A₁₃₉A₁₄₀-6-His und Glu-Δ-6-His

Die mittels Affinitätschromatographie an einer Ni-NTA-Matrix aufgereinigten Konstrukte des Glu-aktivierenden Moduls (Glu-6-His, Glu-A₁₃₉A₁₄₀-6-His, Glu-Δ-6-His) wurden auf kovalenten L-[¹⁴C]Glu Thioestereinbau und Glutaminsäure-abhängigen ATP-PP_i-Austausch getestet.

4.6.2.1 Thioestereinbau und Glutaminsäure-abhängiger ATP-PP_i Austausch

Es wurde der kovalente Thioestereinbau von L-[¹⁴C]Glu in das Glu-aktivierende Modul Glu-6-His und seine Mutanten Glu-A₁₃₉A₁₄₀-6-His und Glu-Δ-6-His als Funktion von der Proteinkonzentration getestet. Diese Reaktion wurde, wie unter 3.2.4.2 beschrieben, durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 4-18 dargestellt.

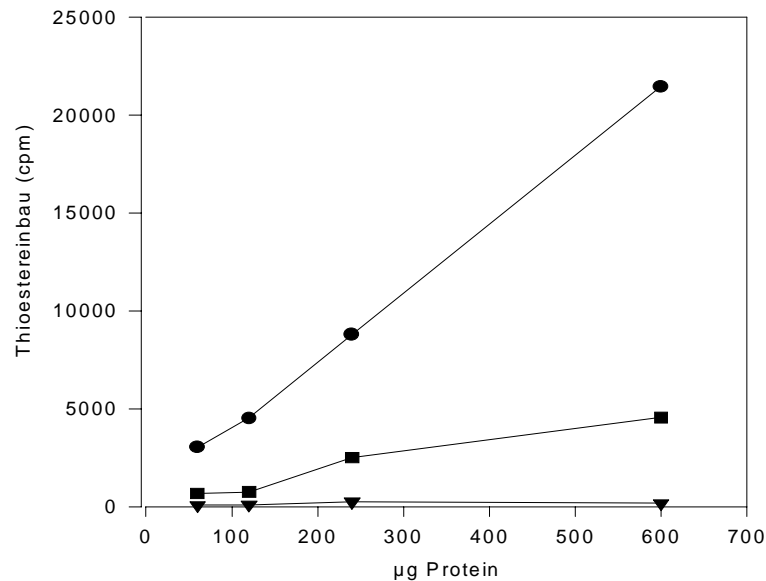


Abbildung 4-18: L[¹⁴C]Glu-Thioestereinbau-Aktivität des Glu-aktivierenden Moduls Glu-6-His und seiner Mutanten Glu-A₁₃₉A₁₄₀-6-His und Glu-Δ-6-His.

Der Thioestereinbau wurde als Funktion von der Proteinmenge untersucht. Er wurde nach 3.2.4.2 durchgeführt. Die Proteinmenge wurde nach Bradford (3.2.6) gemessen. Glu-6-His (●), GluA₁₃₉A₁₄₀-6-His (■) und Glu-Δ-6-His (▼)

Das Glu-6-His-Protein (●) zeigte einen L[¹⁴C]Glu-Thioestereinbau der mit steigender Proteinkonzentration deutlich zunahm. Das heterolog exprimierte Protein war zu ca. 13 % mit dem 4'-PPan-Kofaktor beladen. Das Glu-A₁₃₉A₁₄₀-6-His-Protein (■) zeigte ebenfalls einen Thioestereinbau, der aber im Vergleich mit dem Glu-6-His-Protein deutlich reduziert war. Seine Beladung mit dem 4'-PPan-Kofaktor betrug ca. 3 %. Die Unterschiede im Thioestereinbau zwischen den Proteinen Glu-6-His und Glu-A₁₃₉A₁₄₀-6-His lagen an der unterschiedlichen Beladung mit dem 4'-PPan-Kofaktor und sind daher aller Wahrscheinlichkeit nicht auf die Mutationen der Histidinreste des M-Motivs zurückzuführen. Das Glu-Δ-6-His-Protein (▼) zeigte keinen Einbau. Das erklärt sich dadurch, daß bei dieser Mutante, die vor dem J-Motiv deletiert wurde, keine Bindungsstelle für den 4'-PPan-Kofaktor vorhanden war. Alle drei Glu-Mutanten zeigten jedoch einen Glutaminsäure-abhängigen ATP-PP_i-Austausch in vergleichbarer Größenordnung.

4.6.3 Initiation der *in vitro* Lipopeptidsynthese

Es wurde die Initiation der *in vitro*-Surfactin-Biosynthese mit Hilfe der drei Konstrukte Glu-6-His, Glu-A₁₃₉A₁₄₀-6-His und Glu-Δ-6-His, wie unter 3.2.4.4. beschrieben, untersucht. Als Kontrolle diente ein Ansatz ohne β-HA-CoA. Die Ansätze wurden über Nacht inkubiert und anschließend mit n-Butanol extrahiert. Die gebildeten Produkte wurden dünnschichtchromatographisch aufgetrennt und durch Autoradiographie analysiert.

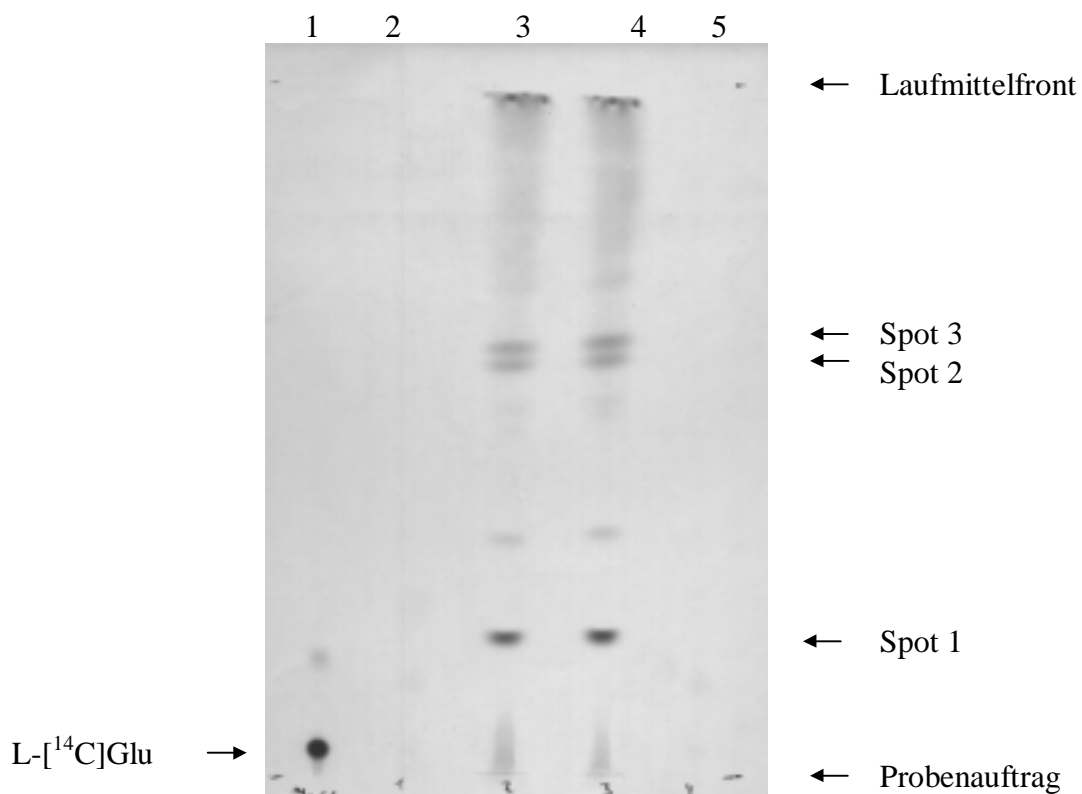


Abbildung 4-19: **Dünnschichtchromatographische Untersuchung der Initiationsprodukte bei der *in vitro*-Surfactin-Biosynthese.**

Es wurde die Aktivität von Glu-6-His, Glu-A₁₃₉A₁₄₀-6-His und Glu-Δ-6-His in der unter 3.2.4.4. beschriebenen Initiationsreaktion der *in vitro*-Surfactin-Biosynthese getestet. Die Reaktionsansätze wurden über Nacht inkubiert und mit n-Butanol extrahiert. Hiervon wurden 25 µl auf eine Kieselgel 60-Platte aufgetragen. Als Laufmittel wurde Chloroform:Methanol:Wasser (65:25:4 v/v/v) verwendet. Die L-[¹⁴C]Glu markierten Produkte wurden mittels Autoradiographie detektiert. Spur 1: L-[¹⁴C]Glu als Referenz, Spur 2: Glu-6-His ohne β-HA-CoA, Spur 3: Glu-6-His mit β-HA-CoA, Spur 4: Glu-A₁₃₉A₁₄₀-6-His mit β-HA-CoA und Spur 5: Glu-Δ-6-His mit β-HA-CoA.

Aus der Abbildung 4-19 ist ersichtlich, daß in den Ansätzen mit den Glu-Konstrukten Glu-6-His und Glu-A₁₃₉A₁₄₀-6-His im wesentlichen drei Initiationsprodukte gebildet wurden (durch Pfeile markiert). Die Produkte mit den R_F-Werten von 0,2 (Spot 1) und 0,62 (Spot 3) wurden schon von C. Ullrich (1991) nachgewiesen. Spot 1 entspricht dem linearen Produkt β -HA-CoA-L-[¹⁴C]-Glu, während Spot 3 der laktonisierten Form entspricht. Spot 2 wurde bisher nicht identifiziert. Im Fall der Mutante Glu- Δ -6-His wurde kein Produkt gebildet. In Abwesenheit des Fettsäuresubstrats konnten ebenfalls keine Initiationsprodukte nachgewiesen werden.

4.6.4 Untersuchung der Initiation der *in vitro*-Surfactin-Biosynthese in Abhängigkeit der E3-Fraktion

In 4.5.3 wurde gezeigt, daß die *in vitro*-Surfactin-Biosynthese ohne eine externe Acyltransferase initiiert werden kann. Zur Untersuchung des Einflusses von E3 auf diesen Prozeß wurde eine kinetische Untersuchung der Bildung der Initiationsprodukte aus β -HA-CoA und Glutaminsäure mit den Glu-Konstrukten Glu-6-His und Glu-A₁₃₉A₁₄₀-6-His durchgeführt. Es wurde jeweils die Initiationsreaktion mit und ohne E3 untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-20 dargestellt.

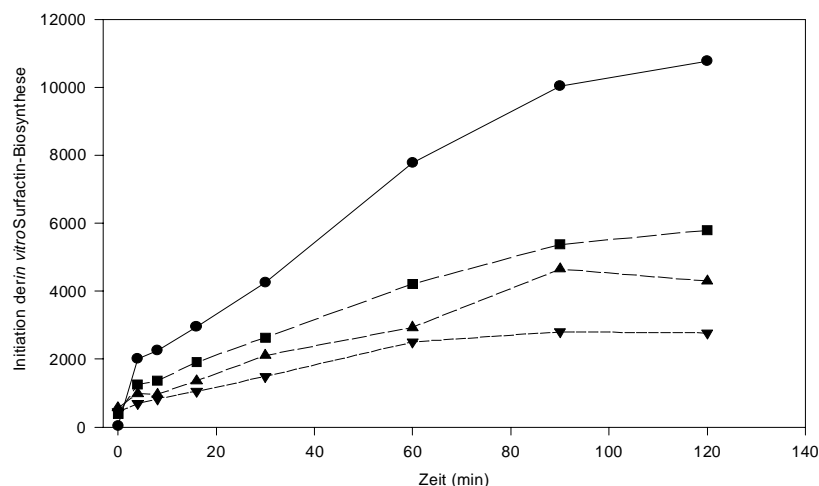


Abbildung 4-20: Kinetik der Bildung der Initiationsprodukte der Surfactin-Biosynthese.

Es wurde das Glu-aktivierende Modul Glu-6-His und die Mutante Glu-A₁₃₉A₁₄₀-6-His mit und ohne E3 inkubiert. Glu-6-His ohne E3 (●), Glu-6-His mit E3 (■), Glu-A₁₃₉A₁₄₀-6-His ohne E3 (▲) und Glu-A₁₃₉A₁₄₀-6-His mit E3 (▼). Die Initiationsprodukte wurden zu verschiedenen Zeitpunkten mit 5% iger TCA präzipitiert, anschließend auf Membranfiltern adsorbiert und ihre Radioaktivität durch Flüssigszintillationszählung gemessen.

Aus der Abb. 4-20 ist ersichtlich, daß E3 die Initiation der *in vitro*-Surfactin-Biosynthese inhibiert. Dies wurde bei dem Glutaminsäure-aktivierenden Modul Glu-6-His und der Mutante Glu-A₁₃₉A₁₄₀-6-His beobachtet. Dieser Effekt ist im Falle von Glu-6-His deutlicher als bei der Glu-A₁₃₉A₁₄₀-6-His-Mutante. Es wurde ein Unterschied in der Bildung der Initiationsprodukte zwischen dem Glutaminsäure-aktivierenden Modul und der Mutante Glu-A₁₃₉A₁₄₀-6-His beobachtet. Das Glu-6-His Protein ist ca. 2,5 fach aktiver als Glu-A₁₃₉A₁₄₀-6-His. Dieser Unterschied wurde ebenfalls im Falle des kovalenten Thioestereinbaus mit L[¹⁴C]-Glutaminsäure beobachtet.

Als Kontrolle für die kinetische Untersuchung der Initiation der *in vitro*-Surfactin-Biosynthese wurde parallel der Zeitverlauf des kovalenten [¹⁴C]-Glu Thioestereinbaus gemessen. Dieser erreichte nach 20 min seinen Maximalwert, während die Bildung der Initiationsprodukte weiteranstieg.

5 Diskussion

5.1 Surfactin-Biosynthese

Für die Untersuchungen der *in vitro*-Surfactin-Biosynthese wurden die Teilenzyme SrfA, SrfB und SrfC, wie unter 3.2.3.1.-3.2.3.4 beschrieben, gereinigt. Es konnte in einer kinetischen Untersuchung gezeigt werden, daß die Synthese von Surfactin mit den Teilenzymen SrfA, SrfB und SrfC ohne Beteiligung der E3 Fraktion möglich ist (s. Abb. 4-12). Dieses steht im Gegensatz zu den von M. Menkhaus beschriebenen Ergebnissen, die zeigte, daß für die Synthese von Surfactin ein weiteres Enzym E3 notwendig ist (Menkhaus 1995).

Es wurde der Einfluß eines reduzierenden Agens (DTE) auf die Surfactin-Biosynthese untersucht. In Gegenwart von DTE wurde eine ca. vierfach höhere Surfactinbildungsrate beobachtet als ohne DTE (s. Abb. 4-12). Der Einfluß von DTE auf die Surfactin-Bildung kann auf zwei Möglichkeiten zurückzuführen sein. Einerseits sind die reaktiven Zentren der Surfactin-Synthetase-Teilenzyme gegenüber oxidativen Prozessen empfindlich und werden durch den Zusatz von DTE zur Reaktionsmischung geschützt. Die andere Möglichkeit besteht darin, daß DTE in die Synthese von Surfactin eingreift. Hierfür ergaben sich erste Hinweise aus massenspektrometrischen Untersuchungen mittels MALDI-MS. Es wurden mit dieser Methode die Massen verschiedener Surfactin-Isoformen gemessen, die jeweils um die Masse von DTE größer waren, als nach der Strukturformel dieses Lipopeptids zu erwarten wäre. Dieses Ergebnis muß jedoch noch verifiziert werden. Es wurde von F. Leenders an der Gramicidin S Synthetase I gezeigt, daß es möglich ist die am 4'-PPan-Kofaktor gebundene Aminosäure auf ein Thiolreagenz zu übertragen (Leenders 1999). Es werden für den 4'-PPan-Kofaktor drei Beladungszustände postuliert: a) eine Beladungs-Position, b) eine Peptidyl-Akzeptor-Position und c) eine Peptidyl-Donator-Position (Stein *et al.* 1996, Vater *et al.* 1997, Belshaw *et al.* 1999). Die am 4'-PPan-Kofaktor gebundene Aminosäure würde nicht mit der am nächsten 4'-PPan-Kofaktor vorliegenden Aminosäure verknüpft werden, sondern auf DTE, das als Akzeptor für die Aminosäure zur Verfügung steht. DTE übernimmt hierbei die spezifische Aminosäure in Konkurrenz zum 4'-PPan-Kofaktor des betreffenden aminosäureaktivierenden Moduls. An der in *E. coli* exprimierten Valindomäne der Surfactin-Synthetase wurde ein ähnliches Ergebnis beobachtet (persönliche Mitteilung Dr. D. Vollenbroich).

In weiteren kinetischen Untersuchungen wurde der Einfluß von E3, MBP-SrfD und N-His₆-YurP auf die *in vitro*-Surfactin-Biosynthese untersucht. Die Proteine SrfD und YurP wurden in *E. coli* heterolog exprimiert (s. Abb. 4-4 und 4-5). SrfD, die externe Thioesterase des Surfactin-Operons, wurde mit dem Maltose-bindenden Protein fusioniert, YurP wurde N-terminal mit sechs Histidinresten markiert.

E3 stimuliert die Surfactin-Biosynthese, wie es bereits in den Arbeiten von C. Ullrich und Menkhaus *et al.* beschrieben wurde (Ullrich 1991, Menkhaus *et al.* 1993). Hier wurde angenommen, daß E3 eine Acyltransferase darstellt, die für die Initiation der Surfactin-Biosynthese notwendig ist. In der hier vorgestellten Arbeit wurde in den E3-Fractionen mit Hilfe des anti-MBP-SrfD-Antikörpers SrfD nachgewiesen (s. Abb. 4-9). Für SrfD wird eine Beteiligung an der Zyklisierung des Surfactins diskutiert. Die Stimulierung der *in vitro*-Surfactin-Biosynthese könnte dann im Gegensatz zu der Annahme von C. Ullrich (1991) und Menkhaus *et al.* (1993) auch durch eine SrfD induzierten Stimulierung der Zyklisierung von Surfactin erklärt werden

Es wurde jedoch kein Einfluß der heterolog exprimierten Proteine MBP-SrfD und N-His₆-YurP auf die *in vitro*-Surfactin-Biosynthese beobachtet (s. Abb. 4-16). Da die Abspaltung des Maltose-bindenden Proteins von SrfD nicht gelang, ist es möglich, daß sich die Faltung des Fusionsproteins von der des nativen SrfD unterscheidet, so daß das Fusionsprotein katalytisch nicht aktiv war. Bei den gentechnisch hergestellten Proteinen MBP-GrsT und 6xHis-GrsT der externen Thioesterase aus dem Gramicidin S Biosynthese-Operon konnte ebenfalls kein stimulierender Einfluß auf die zellfreie Biosynthese von Gramicidin S beobachtet werden (Leenders 1999). Es wurde jedoch in Gegenwart des 6xHis-GrsT mittels MALDI-MS die Bildung von Oligomeren des Pentapeptids von Gramicidin S gemessen.

Auch für YurP wurde keine Stimulierung der *in vitro*-Surfactin-Biosynthese beobachtet. Die Markierung des Proteins mit sechs Histidinresten am N-Terminus kann jedoch auch hier seine Faltung in einer Weise verändert haben, so daß es katalytisch nicht aktiv war.

5.2 Initiation der *in vitro*-Surfactin-Biosynthese

Es mußte ausgeschlossen werden, daß das unter 4.5 erhaltene Ergebnis möglicherweise durch eine mit den Surfactin-Synthetase-Teilenzymen, SrfA, SrfB und SrfC, assoziierte Acyltransferase hervorgerufen wird. Zu diesem Zweck wurden gentechnisch Mutanten des Glutaminsäure-aktivierenden Moduls hergestellt und heterolog in *E. coli* DH5 α

exprimiert. Diese Proteine wurden C-terminal mit sechs Histidinresten markiert, was eine Aufreinigung durch Affinitätschromatographie an einer Ni-NTA-Matrix ermöglichte. Die Untersuchungen des Glutaminsäure-aktivierenden Moduls und der Mutanten auf kovalenten Thioestereinbau von L-[¹⁴C]Glu und Glutaminsäure-abhängigen ATP/PP_i-Austausch zeigten, daß Glu-6-His und die Mutante Glu-A₁₃₉A₁₄₀-6-His beide Aktivierungsreaktionen durchführen konnten. Der Unterschied im Thioestereinbau ist offensichtlich auf die unterschiedliche Beladung der in *E. coli* heterolog exprimierten Proteine mit dem 4'-PPan-Kofaktor zurückzuführen (s. Abb. 4-18). Die Mutante Glu-Δ-6-His zeigte, wie erwartet, keinen Thioestereinbau von L-[¹⁴C]Glu, da hier die Thiolierungsdomäne fehlte (s. Abb. 4-18). Die drei getesteten Proteine wiesen jedoch in der Glutaminsäure-abhängigen ATP/PP_i-Austauschreaktion keine signifikanten Unterschiede auf.

Die Untersuchung der Initiation der *in vitro*-Surfactin-Biosynthese an Glu-6-His und Glu-Δ-6-His ergab, daß im Fall des erstgenannten Proteins Initiationsprodukte gebildet wurden (s. Abb. 4-19). Es wurden drei Produkte nachgewiesen, von denen zwei bereits von C. Ullrich mit synthetisch hergestellten Modellsubstanzen als das lineare bzw. zyklische β-Hydroxyacyl-L-Glutamat identifiziert wurden (C. Ullrich 1991), für die R_f-Werte von 0,2 bzw. 0,62 ermittelt wurden. Das dritte Initiationsprodukt mit einem R_f-Wert von 0,6 konnte bisher nicht zugeordnet werden. Da eine interne Laktonbildung im linearen Initiationsprodukt sehr wahrscheinlich sowohl an der α- als auch an der δ-Carboxygruppe der Glutaminsäure stattfinden kann, könnten die Initiationsprodukte mit den R_f-Werten von 0,6 bzw. 0,62 diesen beiden Laktonen entsprechen. Die Mutante Glu-Δ-6-His lieferte keine Initiationsprodukte (s. Abb. 4-19). Hieraus folgt, daß das Glutaminsäure-aktivierende Modul selbst in der Lage ist, durch Reaktion mit dem Fettsäuresubstrat β-Hydroxytetradecanoyl-CoA Initiationsprodukte zu bilden.

Mit Hilfe der Mutante Glu-A₁₃₉A₁₄₀-6-His sollte versucht werden, die Bindungsstelle für die β-Hydroxy-Fettsäure zu lokalisieren. Dabei wurde insbesondere das M-Motiv (HHIIxDGxSxxIL) der N-terminalen Elongationsdomäne des Glutaminsäure-aktivierenden Moduls auf eine mögliche Funktion bei der Initiation der *in vitro*-Surfactin-Biosynthese untersucht. Durch Sequenzvergleiche wurde festgestellt, daß das M-Motiv bei Enzymen gefunden wird, die Acyl- bzw. Peptidyltransfer-Reaktionen katalysieren, wie z.B. Chloramphenicol-Acetyl- und Dihydrolipoamid-Acyltransferasen (de Crécy-Lagard *et al.* 1995, Marahiel *et al.* 1997). Es wird dabei besonders dem zweiten Histidinrest eine katalytische Funktion zugeordnet. Untersuchungen an Peptid-

Synthetasen zeigten, daß durch Mutationen an dieser Position die Knüpfung der Peptidbindung nicht mehr funktionierte (Stachelhaus *et al.* 1998). An SrfB wurde nachgewiesen, daß auch die Substitution des Aspartats im M-Motiv durch Alanin zu einem Abbruch der Surfactin-Biosynthese führte (Vollenbroich 1996). Es ist jedoch auch die Mutante Glu-A₁₃₉A₁₄₀-6-His zur Bildung von Initiationsprodukte befähigt (s. Abb. 4-19). Eine Beteiligung des M-Motivs der N-terminalen Elongationsdomäne an der Bildung der Initiationsprodukte konnte daher nicht nachgewiesen werden.

Um zu untersuchen, ob E3 die Initiation der *in vitro*-Surfactin-Biosynthese beeinflusst, wurde die Kinetik der Bildung der Initiationsprodukte gemessen. Es wurden das Glu-aktivierende Modul Glu-6-His und die Mutante GluA₁₃₉A₁₄₀-6-His mit und ohne E3 inkubiert (s. Abb. 4-20). Hierbei stimulierte E3 die Bildung der enzymgebundenen Initiationsprodukte nicht. Dies könnte auf die Anwesenheit der externen Thioesterase SrfD zurückzuführen sein, die in den E3-Fractionen immunchemisch nachgewiesen wurde (s. Abb. 4-9). Es wird angenommen, daß dieses Protein an der Zyklisierung von Surfactin beteiligt ist. SrfD könnte daher die Zyklisierung des β -Hydroxyacyl-L-Glutamats katalysieren, wobei das zyklisierte Produkt vom Enzym abdissoziiert und daher im Filterbindungstest nicht nachgewiesen werden konnte.

Um zu überprüfen, ob SrfA eine Erkennungssequenz für die Bindung des Fettsäuresubstrats besitzt, wurde ein Sequenzvergleich durchgeführt. Dazu wurden die N-terminalen Elongationsdomänen des ersten Moduls von Peptid-Synthetasen auf eine mögliche Fettsäure-Bindungsstelle untersucht. Dies erwies sich als schwierig, da bisher zu wenig Sequenzinformationen von Lipopeptid-Synthetasen vorliegen. In den bekannten Sequenzen der Surfactin-, Fengycin- und Lichenysin-Synthetase wurde nach einem Motiv gesucht, das zum FACS-Motiv homolog ist und als Bindungsstelle für Fettsäuren an Acyl-CoA-Synthetasen dient. Diese Domäne ist bei all diesen Enzymen konserviert. Die Funktion des FACS-Motivs beruht hier in der Erkennung und Bindung der Fettsäure bzw. in der Regulation des Transkriptionsfaktors FadR, der für die Regulation der Fettsäure-Biosynthese verantwortlich ist (Black *et al.* 1997, DiRusso *et al.* 1998). Das FACS-Motiv (**DGWLHTGDIG_xW_xP_xG_xLKIIDRKK**) umfaßt 25 Aminosäuren, in dem neun hochkonservierte (fett) und zwölf homologe Aminosäuren (unterstrichen) identifiziert wurden. Die Funktion der einzelnen Aminosäurereste bei der Bindung und Erkennung der Fettsäure wurde durch ortsspezifische Mutagenese untersucht (Black *et al.* 1997).

Der Vergleich der N-terminalen Elongationsdomänen von Peptid-Synthetasen mit dem FACS-Motiv ergab keine Homologie. In einem weiteren Homologievergleich wurde in den Adenylierungsdomänen von Peptid-Synthetasen nach diesem Motiv gesucht. In diesen Vergleich wurde auch die Gramacidin S Synthetase 1 und 2 (GrsA, GrsB) mit einbezogen. In Abbildung 5-1 ist der Bereich der Adenylierungsdomäne verschiedener Peptid-Synthetasen dargestellt, der eine Homologie zum FACS-Motiv aufweist.

	F-Motiv	G-Motiv	
SrfA1	QDPFVPGD RM YRTGDVVRWLPDGTIEEYL GREDDQ VKVRGYRIELGEIEAVIQQ		882
Lica1	EDPFVPGG F MYRTGD AVR WLPDGTVD F IG RKDDQ VKIRGYRIELGEIESVLQG		889
PpsA1	EDPFYPGER MY KTGD VAR WLPDGTVEFL GRTDDQ VKIRGYRIEPGEIEAALRS		879
GrsA	DNPFVPGE KLY KTGD QAR WLS SD GNIEEYL GR IDNQVKIRGHRVELEEVEESILLK		451
PpsA2	ENPFVSGER LY RTGD RAC WLPNGNIRLL GR MDYQVKINGYRIETEEIESVLLQ		1923
PpsB2	SNPYLPGD RL YRTGDLAKRLSNGELEEYL GR IDEQVKVRGHRIELGEIQAALLQ		1918
PpsC2	PHPFAPGD RL YRTGDLARWLS SD GTIEYV GR IDDQVKVRGYRVELGEIETALRQ		1918
PpsD3	QNPFKPEAR MY RTGDAARWMADGTLEEYL GR IDDQVKIRGYRVETKEIESVIRC		2947
Lica3	EDPFVPGER MY RTGDAVKWLEDGRLEYI GR IDQQVKIRGFRIELSEIEVQLAR		2951
SrfA3	ADPFVPGER MY RTGDLVKWTGGG-IEYI GR IDQQVKVRGYRIELSEIEVQLAQ		2954
SrfB3	ADPFVPGER MY RTGDLVKWVNGG-IEYI GR IDQQVKVRGYRIELSEIEVQLAQ		2953
SrfC	ENPFKPGET LY RTGDLARWLPDGTIEYAG GR IDDQVKIRGHRIELEEIEKQLQE		882
GrsB	PNPFVPGE KLY RTGD LAR WMPDGNVEFL GR NDHQVKIRGIRIELGEIEAQLRK		2967
FACS	-----DGWLHTGDIGKWL PNG TLKI ID RKK-----		25

Abbildung 5-1: Sequenzvergleich des FACS-Motivs mit den Aminosäuresequenzen des F- und G-Motivs der ersten Adenylierungsdomänen verschiedener Peptidsynthetasen und von internen Adenylierungsdomänen.

Dargestellt sind die zum FACS-Motiv homologen Bereiche der Adenylierungsdomäne der Surfactin- (SrfA-C), Fengycin- (PpsA-D), Lichenysin- (LicA) Synthetasen sowie der Gramacidin S Synthetase 1 und 2 (GrsA und GrsB). Das F- und G-Motiv der Adenylierungsdomäne ist fett gedruckt. Die zum FACS-Motiv homologen Bereiche sind grau unterlegt. Für den Sequenzvergleich wurde das Programm Clustal W benutzt (Thompson *et al.* 1994).

Diese Homologie befindet sich im Bereich der Motive F und G dieser Domänen. Dem F-Motiv wird eine Rolle bei der Bindung von ATP zugewiesen. Mutationen in diesem Bereich zeigten eine deutliche Reduzierung der Adenylierungsaktivität (Gocht und Marahiel 1994). Das G-Motiv ist ebenfalls an der Adenylierung beteiligt, was durch Affinitätsmarkierungen von Peptid-Synthetasen bestätigt wurde (Pavela-Vrancic *et al.* 1994a). Es wurde in internen Modulen von solchen Multienzymen ebenfalls eine Homologie im Bereich des F- und G-Motives zum FACS-Motiv festgestellt. Allerdings ist hier die Übereinstimmung etwas geringer als in den Adenylierungs-Domänen der ersten Module von Peptid-Synthetasen.

Für die Bindung des Fettsäuresubstrats im Initiationsprozeß der Surfactin-Biosynthese wird folgender Reaktionsmechanismus vorgeschlagen: Die Erkennung des Fettsäuresubstrats im Bereich des FACS-Motivs erfolgt sehr wahrscheinlich nach der Bindung der Substrataminosäure. Diese wird in der Adenylierungsdomäne erkannt und nach Aminoacyladenylat-Aktivierung auf den 4'-PPan-Kofaktor in der Thiolierungsdomäne übertragen. Danach kann die Fettsäure im Bereich des FACS-Motivs gebunden und mit der am 4'-PPan-Kofaktor befindlichen Aminosäure verknüpft werden. Auf diese Weise bilden sich die Initiationsprodukte.

Eine andere Hypothese für den Ablauf des Initiationsprozesses besteht darin, daß die Fettsäure, die an ein Acyl-Carrier-Protein gebunden vorliegt, mit der am 4'-PPan-Kofaktor der Thiolierungsdomäne des Glu-Moduls von SrfA gebundenen Glutaminsäure reagiert. Das Acyl-Carrier-Protein würde dann sehr wahrscheinlich bei der Knüpfung der Peptidbindung mit der N-terminalen Elongationsdomäne im Bereich des M-Motivs wechselwirken. Es konnte bei der Biosynthese verschiedener anderer bioaktiver Peptide nachgewiesen werden, daß ein Acyl-Carrier-Protein den für solche Reaktionen notwendigen 4'-PPan-Kofaktor zu Verfügung stellt. Diese Acyl-Carrier-Protein-Gensequenzen werden in der Nähe des Genclusters oder als Bestandteil der Gene der Teilenzyme gefunden. Hierbei handelt es sich entweder um externe Proteine oder integrierte Acyl-Carrier-Protein-Domänen. Es wurde z.B. bei der Actinomycin-Biosynthese gezeigt, daß ein Acyl-Carrier-Protein den fehlenden 4'-PPan-Kofaktor für die Bindung von 4-Methyl-3-Hydroxyanthranilsäure (4-MHA) zur Verfügung stellt. Die Initiation erfolgt hier durch Verknüpfung der 4-MHA mit Threonin (Pfennig *et al.* 1999). Ein ähnlicher Mechanismus wurde auch bei der Enterobactin-Biosynthese gefunden (Gehring *et al.* 1997). Es wurde gezeigt, daß EntB ein bifunktionelles Enzym ist. N-terminal weist es eine Isochorismat-Lyase-Domäne bzw. C-terminal eine Aryl-Carrier-Protein-Domäne auf, die dem Acyl-Carrier-Protein funktionell ähnlich ist. Diese dient als Carrier-Protein für die Dihydroxybenzoesäure. Bei der Yersiniabactin-Biosynthese wurde gezeigt, daß das Protein HMWP2 N-terminal eine Aryl-Carrier-Protein-Domäne aufweist. Diese wird von YbtE, einer Salicyl-AMP-Ligase, mit Salicylsäure beladen. HMWP2 initiiert dann die Synthese von Yersiniabactin durch Übertragung der Salicylsäure auf Cystein (Gehring *et al.* 1998). Bei der Mycosubtilin-Synthetase wurde am N-Terminus vom MycA ein Reihe von Funktionseinheiten nachgewiesen, die Homologien zu Proteinen der Fettsäure- und Polyketid-Synthese aufweisen (Duitman *et al.* im Druck), die die letzten Schritte des β -Aminofettsäurebausteins von Mycosubtilin

katalysieren. Die Initiation der Synthese dieses Lipopeptids erfolgt dann durch die Übertragung des Fettsäuresubstrats auf Asparagin. Die bekannte Genomsequenz von *B. subtilis* zeigt jedoch in der Umgebung des Surfactin- und Fengycin-Operons keine Acyl-Carrier-Protein-Sequenz. Es konnte hier nur das Acyl-Carrier-Protein der Fettsäure-Biosynthese, das AcpA, nachgewiesen werden (Kunst *et al.* 1997). Ob dieses an der Initiation der Surfactin-Biosynthese beteiligt ist, muß noch untersucht werden.

5.3 Studien zur Identifizierung von E3

5.3.1 Identifizierung des 40 kDa Proteins aus der E3-Fraktion

Beim Versuch, in den E3-Fraktion, das für die Initiation der Surfactin-Biosynthese verantwortliche Protein zu identifizieren, ergaben sich Hinweise auf mindestens drei Enzyme, die in der Lage waren, die *in vitro*-Surfactin-Biosynthese zu stimulieren. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde von M. Menkhaus und E. Mahlitz ein 40 kDa Protein aufgereinigt und N-terminal bzw. intern ansequenziert (Menkhaus 1995, Mahlitz 1997). In der hier vorgestellten Arbeit wurde mit Hilfe der gewonnenen Proteinsequenzen mittels PCR aus der chromosomalen DNA von *B. subtilis* OKB 105 das Gen des 40 kDa Proteins amplifiziert und sequenziert (s. Abb. 4-3). Die *B. subtilis* Genom-Datenbankrecherche der erhaltenen Nukleotidsequenz ergab, daß es sich hier um das Gen *yurP* handelt, dessen Funktion noch unbekannt ist. Durch Sequenzvergleiche sollte eine mögliche Funktion des YurP-Proteins ermittelt werden. Hierbei wurde eine Homologie zu dem MocD- und Mas2`-Protein aus *Agrobacterium tumefaciens* festgestellt, denen eine Rolle beim Katabolismus und Anabolismus des Mannopins zugeschrieben wird (Kim *et al.* 1996a/b). Die Homologie zwischen MocD und YurP ist ca. 10 % höher als zwischen Mas2` und YurP (s. Tabelle 3). Beim Vergleich der drei Proteine miteinander konnte keine Konsensussequenz gefunden werden.

Mannopin gehört zur Klasse der Mannityl-Opine. Diese werden durch Induktion eines Ti- oder Ri-Plasmids in Pflanzen gebildet. Diese enthalten die Gene für die Synthese und den Katabolismus des jeweiligen Opins. Jedes *Agrobacterium* kann nur diejenigen Opine katabolisieren, deren Synthese es vorher in der Pflanze induziert hat (Hayman und Farrand 1990). Die gebildeten Opine werden von *Agrobacterium* als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle genutzt. MocD hat die Aufgabe, das Zwischenprodukt Santhopin in Glutamin und Mannose zu spalten. In Abb. 5-2 ist die postulierte Synthese bzw. der Abbau von Mannopin dargestellt.

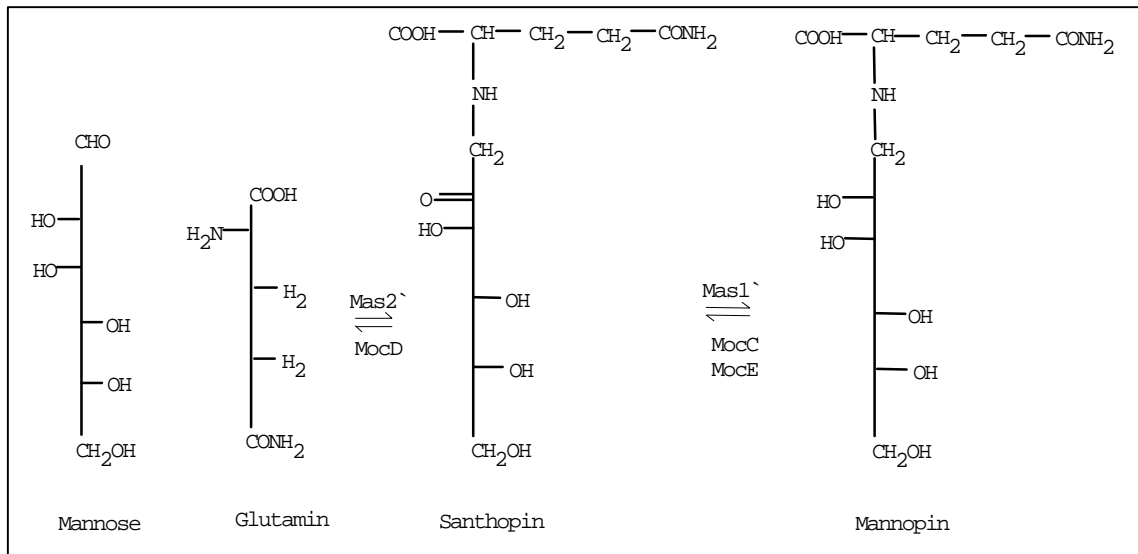


Abbildung 5-2: Schematische Darstellung des postulierten Synthese- und Abbauwegs von Mannopin.

Dargestellt sind die Strukturformeln der Ausgangs-, Zwischen- und Endprodukte der Mannopinsynthese. Die Enzyme oberhalb der Pfeile sind für die Synthese von Mannopin bzw. unterhalb der Pfeile für den Abbau verantwortlich. Es sind nicht alle Proteine des Mannopin-Katabolismus dargestellt. Mannose wird von den Enzymen MocA und MocB weiter abgebaut. Die regulatorischen Proteine MocR und MocS sind ebenfalls nicht dargestellt.

Der Mechanismus der Synthese von Mannopin ist noch nicht vollständig geklärt. Man nimmt jedoch an, daß daran die Proteine Mas2', Mas1' und Mas0' beteiligt sind. Mas2' wird eine Konjugase-Funktion zugeschrieben, wobei Glutamin und Mannose miteinander verknüpft werden (Ellis *et al.* 1984). Das dabei entstehende Produkt Santhopin kann aber auch in einer nichtenzymatischen Reaktion gebildet werden (Gerhardinger *et al.* 1994). Mas1' ist eine Reduktase, die für die Umwandlung von Santhopin in Mannopin verantwortlich ist. Mas0' laktonisiert Mannopin zu Agropin.

Am Mannopin-Katabolismus sind insgesamt acht Proteine beteiligt. Es gibt in *B. subtilis* fünf Gene, die Proteine kodieren, die Homologien zu Proteinen des Mannopin-Katabolismus aus *Agrobacterium tumefaciens* aufweisen. Für die Proteine MocS, MocB und AgaC konnten keine homologen Proteine in *B. subtilis* identifiziert werden. In Tabelle 3 sind die Proteine aus *Agrobacterium tumefaciens*, die am Mannopin-Katabolismus beteiligt sind, und die entsprechenden homologen Proteine aus *B. subtilis*, aufgelistet.

Tabelle 3: Proteine aus *B. subtilis*, die Homologien zu Proteinen des Mannopin-Katabolismus aus *Agrobacterium tumefaciens* aufweisen, mit Angabe ihrer vermuteten Funktionen in *Agrobacterium tumefaciens* und der Homologie der jeweiligen Proteine zueinander.

<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Funktion im <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Homologie (%)	
			Identisch	homolog
	AgcA	Mannopin-Zyklase		
YurL	MocE	Kinase	37	51
YurP	MocD	Dekonjugase	29	68
YisW	MocR	Repressor	20	45
YurR	MocC	Mannopin-Oxireduktase	16	39
	MocB	6-Phospho-Gluconate-dehydratase		
YrbE	MocA	6-Phospho-Gluconate-dehydrogenase	14	49
	MocS	Repressor		

Da *B. subtilis* und *Agrobacterium tumefaciens* Bodenbakterien sind, kann ein Gentransfer vom *Agrobacterium* zu *Bacillus* stattgefunden haben. *B. subtilis* ist in der Lage, durch Lipopeptide, wie Surfactin, andere Bakterien zu lysieren und deren DNA aufzunehmen (Tsukagoshi *et al.* 1970, Maget-Dana und Ptak 1995). Die Funktion der in Tabelle 3 aufgelisteten Proteine aus *B. subtilis* ist noch ungeklärt. Sie könnten aber wie im *Agrobacterium* dazu dienen, Opine als Kohlenstoff- und Stickstoffquellen zu nutzen.

5.3.2 Immunchemische Identifizierung von SrfD aus der E3-Fraktion

Es wurde in dieser Arbeit SrfD in den Fraktionen der Aca34-Gelfiltration mit Hilfe des anti-MBP-SrfD-Antikörpers aus Kaninchen nachgewiesen. Es wurde in zwei Fraktionsbereichen eine Reaktion mit diesem Antikörper gefunden, wobei die kreuzreagierenden Proteine Molmassen von ca. 30 kDa bzw. 60 kDa aufwiesen (s. Abb. 4-7). Dies deutet auf eine Dimerisierung von SrfD hin. Eine ähnliche Situation wurde im Falle von GrsT, dem entsprechenden Thioesterase-Protein des Gramicidin S Biosynthese-Operons beobachtet (persönliche Mitteilung F. Leenders).

Bei der Aufreinigung der E3-Fraktionen durch hochauflösende Anionenaustauscherchromatographie an MonoQ HR5/5 ergaben sich drei Fraktionsbereiche, in denen *in vitro*-Surfactin-Biosynthese beobachtet wurde (s. Abb. 4-10). Dies wurde bereits von M. Menkhaus beschrieben (Menkhaus 1995). Dieses Ergebnis deutet daraufhin, daß mehrere Proteine in der Lage sind, die Surfactin-Biosynthese zu stimulieren. Auch hier konnte in den erhaltenen Fraktionen mit Hilfe des anti-MBP-SrfD-Antikörpers SrfD nachgewiesen

werden. Es wurden zwei Immunantworten detektiert, von denen eine mit der Stimulierung der *in vitro*-Surfactin-Biosynthese im Fraktionsbereich III korrelierte, die zweite Immunantwort wurde im Minimum zwischen den Fraktionsbereich II und III detektiert (s. Abb. 4-11). Dies deutet darauf hin, daß SrfD in zwei Konformationen auftreten kann. Dies muß aber noch genauer untersucht werden.

Die Funktion der Thioesterase-homologen Proteine bei der Peptid- und Polyketid-Biosynthese ist noch ungeklärt. Es gibt jedoch Hinweise darauf, daß sie an der Zyklisierung der Endprodukte beteiligt sind (Butler *et al.* 1999, Schneider und Marahiel 1998). Untersuchungen mit Deletionsmutanten im Surfactin-Operon ergaben, daß durch Deletion von *srfD* die Surfactin-Produktion um 80% reduziert wurde. Die Entfernung der C-terminalen Thioesterasedomäne führte zu einem fast vollständigen Verlust der Surfactin-Synthese (Schneider und Marahiel 1998). Ein Versetzen der C-terminalen Thioesterase an den C-Terminus anderer Module des Surfactin-Operons führte zur Bildung verkürzter Produkte (de Ferra *et al.* 1997). Untersuchungen an Polyketid-Synthasen zeigten ein ähnliches Ergebnis. Die Deletion von TyloO, dem Thioesterase-homologen-Protein aus dem Tylosin-Operon, führte zu einer 85%igen Reduktion der Tylosin-Produktion im Vergleich zum Wildtyp (Butler *et al.* 1999). GrsT, das Thioesterase-homologe Protein bei der Gramacidin S-Biosynthese, ist sehr wahrscheinlich an der Zyklisierung von Gramacidin S beteiligt. Durch Untersuchungen der zellfreien Biosynthese von Gramacidin S hat F. Leenders mittels MALDI-MS gezeigt, daß in Anwesenheit von überexprimiertem GrsT Oligomere des Pentapeptides (Phe-Pro-Val-Orn-Leu) entstehen (F. Leenders 1999).

Eine weitere mögliche Funktion der externen Thioesterasen besteht in einem „proof reading“, in dem sie von den Reaktionszentren von Peptid-Synthetasen und Polyketid-Synthetasen den Fehleinbau substratanaloger Verbindungen eliminieren. Dies wird z.B. bei der Synthese von Surfactin und Tylosin diskutiert (Schneider und Marahiel 1998, Butler *et al.* 1999). Bei der Biosynthese des Enterobactins aus *E. coli* wurde für das Thioesterase-homologe Protein EntF gezeigt, daß dieses bifunktionelle Protein an der Elongation und Zyklisierung von Enterobactin beteiligt ist (Shaw-Reid *et al.* 1999).

5.4 Ausblick

Zur vollständigen Aufklärung, welches Protein die Stimulierung der *in vitro*-Surfactin-Biosynthese bei der Zugabe von E3 hervorruft, sollten die beiden Proteine SrfD und YurP genauer untersucht werden. Beide Proteine konnte in der E3-Fraktion nachgewiesen werden. Die weitere Aufreinigung der E3-Fraktion durch hochauflösende Anionenaustauscher-FPLC ergab eine Aufspaltung in drei Bereiche, in denen *in vitro*-Surfactin-Biosynthese und auch SrfD nachgewiesen werden konnte. Um die Funktion von SrfD aufzuklären, muß dieses Protein bis zur Homogenität gereinigt werden. Ein anderer Ansatz sollte über gentechnisch hergestelltes SrfD versucht werden. Da die bisherigen Untersuchungen mit dem MBP-SrfD-Fusionsprotein keine Aussage über die Funktion von SrfD zulassen, sollte dieses Protein C-terminal mit sechs Histidinresten markiert werden. In ähnlicher Weise sollte mit YurP verfahren werden. Eine weitere Möglichkeit ist die Herstellung von „knock out“ Mutanten, mit deren Hilfe man eventuell die Funktion dieses Proteins aufklären kann. Außerdem sollte die Homologie zwischen YurP und MocD weiter untersucht und geprüft werden, ob

B. subtilis in der Lage ist, Opine als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle zu nutzen.

Die Bindung des Fettsäuresubstrats im Glutaminsäure-aktivierenden Modul von SrfA muß ebenfalls noch genauer untersucht werden. Wenn dessen Bindung im Bereich des F- und G-Motivs der Adenylierungsdomäne stattfindet, ist es jedoch schwierig, durch ortsspezifische Mutagenese Aussagen zu treffen, da jede Mutation in diesem Bereich auch zu einer Verminderung der Aminoacyladenylat-Bildung führen würde. Die Möglichkeit, ob die Surfactin-Biosynthese mit Hilfe des Acyl-Carrier-Proteins der Fettsäure-Synthese initiiert werden kann, muß anhand des gentechnisch hergestellten Proteins untersucht werden. Auf diese Weise könnte dann auch geklärt werden, ob das M-Motiv der N-terminalen Elongationsdomäne des ersten Moduls von Peptid-Synthetasen eine Funktion bei der Erkennung und Bindung des Acyl-Carrier-Proteins hat.

6 Literaturverzeichnis

Arima, K., Kakinuma, A., Tamura, G. (1968). Surfactin, a crystalline peptide-lipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: Isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **31**, 488-494

Belshaw, P.J., Walsh, C.T., Stachelhaus, T. (1999). Aminoacyl-CoA as probes of condensation domain selectivity in nonribosomal peptide synthesis. *Science* **284**, 486-489

Bernheimer, A.W., Avigad, L.S. (1970). Nature and properties of a cytolytic agent produced by *Bacillus subtilis*. *J. Gen. Microbiol.* **61**, 361-369

Besson, F., Peypoux, F., Michel, G., Delcambe, L. (1976). Characterization of iturin A in antibiotics from various strains of *Bacillus subtilis*. *J. Antibiot. (Tokyo)* **29**, 1043-1049

Besson, F., Michel, G. (1984). Action of the antibiotics of the iturin group on artificial membranes. *J. Antibiot. (Tokyo)* **37**, 646-651

Besson, F., Quentin, M.-J., Michel, G. (1989). Action of mycosubtilin on erythrocytes and artificial membranes. *Microbios.* **59**, 137-143

Black, P.N., Zhang, Q., Weimar, J.D., DiRusso, C.C. (1997). Mutational analysis of a fatty acyl-coenzyme A synthetase signature motif identifies seven amino acid residues that modulate fatty acid substrate specificity. *J. Biol. Chem.* **272**, 4896-4903

Blecher, M. (1981) Synthesis of long-chain fatty acyl-CoA thioesters using N-hydroxysuccinimide esters. *Methods in Enzymology* **72**, 404-408

Borchert, S., Stachelhaus, T., Marahiel, M.A. (1994). Induction of surfactin production in *Bacillus subtilis* by *gsp*, a gene located upstream of the gramicidin S operon in *Bacillus brevis*. *J. Bacteriol.* **176**, 2458-2462

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254

Brady, L., Brzozowski, M., Derewenda, Z.S., Dodson, E., Dodsén, G., Tolley, S., Turkenburg, J.P., Christiansen, L., Høge-Jensen, B., Nørskov, L., Thim, L., Menge, U. (1990). A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. *Nature* **343**, 767-770

Brenner, S. (1988). The molecular evolution of genes and proteins: a tale of two serines. *Nature* **334**, 528-530

Butler, A.R., Bate, N., Cundliffe, E. (1999). Impact of thioesterase activity on tylosin biosynthesis in *Streptomyces fradiae*. *Chem. Biol.* **6**, 287-292, 1999.

- Conti, E., Franks, N.P., Bricks, P.** (1996). Crystal structure of firefly luciferase throws light on a superfamily of adenylate-forming enzymes. *Structure* **4**, 287-298
- Conti, E., Stachelhaus, T., Marahiel, M.A., Brick, P.** (1997). Structural basis for the activation of phenylalanine in the non-ribosomal biosynthesis of gramicidin S. *EMBO J.* **16**, 4174-4183
- Cortes, J., Wiesmann, K.E.H., Roberts, G.A., Brown, M.J.B., Staunton, J., Leadlay, P.F.** (1995). Repositioning of a domain in a modular polyketide synthase to promote specific chain cleavage. *Science* **268**, 1487-1489
- Cosmina, P., Rodriguez, F., de Ferra, F., Grandi, G., Perego, M., Venema, G., van Sinderen, D.** (1993). Sequence and analysis of the genetic locus responsible for surfactin synthesis in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **8**, 821-831
- de Crécy-Lagard, V., Marliere, P., Saurin, W.** (1995). Multienzymatic non-ribosomal peptide biosynthesis: identification of the functional domains catalysing peptide elongation and epimerization. *C. R. Acad. Sci. Paris* **318**, 927-936
- de Ferra, F., Rodriguez, F., Tortora, O., Tosi, C., Grandi, G.** (1997). Engineering of peptide synthetases: Key role of the thioesterase-like domain for efficient production of recombinant peptides. *J. Biol. Chem.* **272**, 25304-25309
- DiRusso, C.C., Tsvetnisky, V., Hojrup, P., Knudsen, J.** (1998). Fatty acyl-CoA binding domain of the transcription factor FadR. *J. Biol. Chem.* **273**, 33652-33659
- Dittmann, J., Wenger, R.M., Kleinkauf, H., Lawen, A.** (1994). Mechanism of cyclosporin A biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **269**, 2841-2846
- Duitman, E.H., Hamoen, L. W., Rembold, M., Venema, G., Seitz, H., Saenger, W., Bernhard, F., Reinhardt, R., Schmitt, M., Ullrich, C., Stein, T., Leenders, F., Vater, J** (2000). The mycosubtilin synthetase of *Bacillus subtilis* ATCC6633: a multifunctional hybrid between a peptide synthetase, amino transferase and fatty acid synthetase (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, in press)
- Eikhom, T.S., Jonson, J., Laland, S., Refsvik, T.** (1963). On the biosynthesis of gramicidin S. *Biochim. Biophys. Acta* **76**, 465-468
- Ellis, J.G., Ryder, M.M., Tate, M.E.** (1984). *Agrobacterium tumefaciens* T_R-DNA encodes a pathway for agropine biosynthesis. *Mol. Gen. Genet.* **195**, 466-473
- Finocchiaro, G., Taroni, F., Rocchi, M., Martin, A.L., Colombo, I., Tarelli, G.T., DiDonato, S.** (1991). cDNA cloning, sequence analysis, and chromosomal localization of the gene for human carnitine palmitoyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 661-665
- Fleming, A.** (1929). On the antibacterial action of cultures of a *penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *Brit. J. Exp. Path.* **10**, 226-236

Fuma, S., Fujishima, Y., Corbell, N., D'Souza, C., Nakano, M.M., Zuber, P., Yamane, K. (1993). Nucleotide sequence of 5' portion of *srfA* that contains the region required for competence establishment in *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res.* **21**, 93-97

Gehring, A.M., Bradley, K.A., Walsh, C.T. (1997). Enterobactin biosynthesis in *Escherichia coli*: isochorismate lyase (EntB) is a bifunctional enzyme that is phosphopantetheinylated by EntD and then acylated by EntF using ATP and 2,3-dihydroxybenzoate. *Biochemistry* **36**, 8495-8503

Gehring, A.M., Mori, I., Perry, R.D., Walsh, C.T. (1998). The nonribosomal peptide synthetase HMWP2 forms a thiazoline ring during biogenesis of yersiniabactin, an iron-chelating virulence factor of *Yersinia pestis*. *Biochemistry* **37**, 11637-11650

Genest, M., Marion, D., Caille, A., Ptak, M. (1987). Modeling and refinement of the conformation of mycosubtilin in solution from two-dimensional NMR-data. *Eur. J. Biochem.* **169**, 389-398

Gerhardinger, C., Taneda, S., Marion, M.S., Monnier, V.M. (1994). Isolation, purification, and characterization of an amadori product binding protein from a *Pseudomonas* sp. soil strain. *J. Biol. Chem.* **269**, 27297-27302

Gevers, W., Kleinkauf, H., Lipmann, F. (1969). Peptidyl transfers in gramicidin S biosynthesis from enzyme-bound thioester intermediates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **63**, 1335-1342

Gocht, M., Marahiel, M.A. (1994). Analysis of core sequence in the D-Phe activating domain of the multifunctional peptide synthetase TycA by site-directed mutagenesis. *J. Bacteriol.* **176**, 2654-2662

Gokhale, R.S., Hunziker, D., Cane, D.E., Khosla, C. (1999). Mechanism and specificity of the terminal thioesterase domain from the erythromycin polyketide synthase. *Chem. Biol.* **6**, 117-125

Grossman, T.H., Tuckman, M., Ellestad, S., Osburne, M.S. (1993). Isolation and characterization of *Bacillus subtilis* genes involved in siderophore biosynthesis: Relationship between *B. subtilis* *sfp*⁰ and *Escheria coli* *entD* genes. *J. Bacteriol.* **175**, 6203-6211

Haese, A., Schubert, M., Herrmann, M., Zocher, R. (1993). Molecular characterization of enniatin synthetase gene encoding a multifunctional enzyme catalyzing N-methyldepsipeptide formatin in *Fusarium scirpi*. *Mol. Microbiol.* **7**, 905-914

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-563

- Hanke, C., Wolter, F.P., Coleman, J., Peterek, G., Frentzen, M.** (1995). A plant acyltransferase involved in triacylglycerol biosynthesis complements an *Escherichia coli* sn-1-acylglycerol-3-phosphate acyltransferase. *Eur.J.Biochem.* **232**, 806-810
- Hayman, G.T., Farrand, S.K.** (1990). *Agrobacterium* plasmids encode structurally and functionally different loci for catabolism of agrocinopine-type opines. *Mol. Gen. Genet* **223**, 465-473
- Heath, R.J., Rock, C.O.** (1998). A conserved histidine is essential for glycerolipid acyltransferase catalysis. *J. Bacteriol.* **180**, 1425-1430
- Heath, R.J., Goldfine, H., Rock, C.O.** (1997). A gene (*plsD*) from *Clostridium butyricum* that functionally substitutes for the sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase gene (*plsB*) of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179**, 7257-7263
- Hiramoto, M., Okada, K., Nagai, S.** (1970). The revised structure of viscosin, a peptide antibiotic. *Tetrahedron Lett.* **13**, 1087-1900
- Hiramoto, M., Okada, K., Nagai, S., Kawamoto, H.** (1971). The structure of viscosin, a peptide antibiotic. I. Syntheses of D- and L-hydroxyacyl-L-leucin hydrazides related to viscosin. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **19**, 1308-1314
- Imai, Y., Sugino, H., Fujita, T., Kakinuma, A.** (1971). Hypocholesterolemic effect of surfactin, a novel bacterial peptidelipid. *Takeda. Res. Lab.* **30**, 728-734
- Itokawa, H., Miyashita, T., Morita, H., Takeya, K., Hirano, T. Homma, M., Oka, K.** (1994). Structural and conformational studies of (Ile⁷) and (Leu⁷) surfactins from *Bacillus subtilis natto*. *Chem. Pharm. Bull.* **42**, 604-607
- Kameda, Y., Matsui, K., Kato, H., Yamada, T., Sagai, H.** (1972). Antitumor activity of *Bacillus natto*. III. Isolation and characterization of a cytolytic substance on Ehrlich ascites carcinoma cells in the culture medium of *Bacillus natto* KMD 1126. *Chem. Pharm. Bull.* **20**, 1551-1557
- Kameda, Y., Ouhira, S., Matsui, K., Kanamoto, S., Hase, T., Atsusaka, T.** (1974). Antitumor activity of *Bacillus natto*. V. Isolation of surfactin in the medium of *Bacillus natto* KMD 2311. *Chem. Pharm. Bull.* **22**, 938-944
- Karpas, A., Lowdell, M., Jacobson, S.K., Hill, F.** (1992). Inhibition of human immunodeficiency virus and growth of infected T cells by the immunosuppressive drugs cyclosporin A and FK 506. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 8351-8355
- Katz, E., Demain, A.L.** (1977). The peptide antibiotics of *Bacillus*: Chemistry, biogenesis and possible functions. *Bacteriol. Rev.* **41**, 449-474
- Kim, K., Chilton, W.S., Farrand, S.K.** (1996 a). A Ti plasmid encoded enzyme required for degradation of mannopine is functionally homologous to the T-region encoded enzyme required for synthesis of this opine in crown gall tumors. *J. Bacteriol.* **178**, 3285-3292

- Kim, K., Farrand, S.K.** (1996 b). Ti plasmid-encoded genes responsible for catabolism of the crown gall opine mannopine by *Agrobacterium tumefaciens* are homologs of the T-region genes responsible for synthesis of this opine by the plant tumor. *J. Bacteriol.* **178**, 3275-3284
- Kleinkauf, H., von Döhren, H.** (1990). Nonribosomal biosynthesis of peptide antibiotics. *Eur. J. Biochem.* **192**, 1-15
- Kleinkauf, H., von Döhren, H.** (1996). A nonribosomal system of peptide biosynthesis. *Eur. J. Biochem.* **236**, 335-351
- Kluge, B., Vater, J., Salnikov, J., Eckart, K.** (1988). Studies on the biosynthesis of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis* ATCC 21332. *FEBS Lett.* **231**, 107-110
- Krätzschmar, J., Krause, M., Marahiel, M.A.** (1989). Gramicidin S biosynthesis operon containing the structural genes *grsA* and *grsB* has an open reading frame encoding a protein homologous to fatty acid thioesterases. *J. Bacteriol.* **171**, 5422-5429
- Kume, K., Shimizu, T.** (1997). cDNA cloning and expression of murine 1-Acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **237**, 663-666
- Kunst et al.** (1997). The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* **390**, 249-256
- Kunz, J., Hall, M.N.** (1993). Cyclosporin A, FK506 and rapamycin: more than just immunosuppression. *Trends Biochem. Sci.* **18**, 334-338
- Kurahashi, K.** (1974). Biosynthesis of small peptides. *Annu. Rev. Biochem.* **43**, 445-459
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685
- Laland, S.G., Zimmer, T.-L.** (1973). The protein thiotemplate mechanism of synthesis for the peptide antibiotics produced by *Bacillus brevis*. *Essays Biochem.* **9**, 31-57
- Lambalot, R.H., Gehring, A.M., Flugel, R.S., Zuber, P., LaCelle, M., Marahiel, M.A., Reid, R., Khosla, C., Walsh, C.T.** (1996). A new enzyme superfamily - the phosphopantetheinyl transferases. *Chemistry and Biology* **3**, 923-936
- Landy, M., Warren, G.H., Rosenman, S.B., Colio, L.G.** (1948). Bacillomycin: an antibiotic from *Bacillus subtilis* active against pathogenic fungi. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **67**, 539-541
- Lee, S.G., Lipmann, F.** (1974). Isolation of a peptidyl-pantetheine-protein from tyrocidine-synthesizing polyenzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**, 607-611

- Leenders, F.** (1999). Untersuchung von Zellfabriken für bioaktive Peptide aus *Bacillus brevis* und *Bacillus subtilis*. Dissertation, Technische Universität Berlin
- Leenders, F., Vater, J., Stein, T., Franke, P.** (1998). Characterization of the binding site of the tripeptide intermediate D-phenylalanyl -L-prolyl - L- valine in gramicidin S biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **273**, 18011-18014
- Lipmann, F.** (1954). On the mechanisms of some ATP-linked reactions and certain aspects of protein synthesis. in: The mechanism of enzyme action (McElroy, W.D. & Glass, B., Hrsg). John Hopkins University, Baltimore , 599
- Lipmann, F.** (1973). Nonribosomal polypeptide synthesis on polyenzyme templates. *Acc. Chem. Res.* **6**, 361-367
- Mach, B., Reich, E., Tatum, E.L.** (1963). Separation of the biosynthesis of the antibiotic polypeptide tyrocidine from protein biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **50**, 175-181
- MacCabe, A.P., van Liempt, H., Palissa, H., Unkles, S.E., Riach, M.B.R., Pfeifer, E., von Döhren, H., Kinghorn, J.R.** (1991). δ -(L- α -aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine synthetase from *Aspergillus nidulans*. *J. Biol. Chem.* **266**, 12646-12654
- Maget-Dana, R., Ptak, M.** (1995). Interaction of surfactins with membrane models. *Biophys. J.* **68**, 1937-1942
- Mahlitz, E.** (1997) Untersuchung der Lipopeptidsynthese im *Bacillus subtilis* Diplomarbeit, Technische Universität Berlin
- Marahiel, M.A.** (1992). Multidomain enzymes involved in peptide synthesis. *FEBS* **307**, 40-43
- Marahiel, M.A., Stachelhaus, T., Mootz, H.D.** (1997). Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis. *Chem. Rev.* **97**, 2651-2673
- Menkhaus, M.** (1995). Untersuchung der strukturellen und funktionellen Organisation der Surfactinsynthetase aus *Bacillus subtilis*. Dissertation, Technische Universität Berlin
- Menkhaus, M., Ullrich, C., Kluge, B., Vater, J., Vollenbroich, D., Kamp, R.M.** (1993). Structural and functional organization of the surfactin synthetase multienzyme system. *J. Biol. Chem.* **268**, 7678-7684
- Mittenhuber, G., Weckermann, R., Marahiel, M.A.** (1989). Gene cluster containing the genes for tyrocidine synthetases 1 and 2 from *Bacillus brevis*: Evidence for an operon. *J. Bacteriol.* **171**, 4881-4887
- Modif, M.R., Marahiel, M.A., Ficner, R., Reuter, K.** (1999). Crystallization and preliminary crystallographic studies of Sfp: a phosphopantetheinyl transferase of modular peptide synthetases. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr* **55**, 1098-1100

- Mootz, H.D., Marahiel, M.A** (1997). The tyrocidine biosynthetic operon of *Bacillus brevis*: Complete nucleotide sequence and biochemical characterization of functional internal adenylation domains. *J. Bacteriol.* **197**, 6843-6850
- Nakano, M.M., Magnuson, R., Myers, A., Curry, J., Grossman, A.D., Zuber, P.** (1991). *srfA* is an operon required for surfactin production, competence development, and efficient sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **173**, 1770-1778
- Nakano, M.M., Corbell, N., Besson, J., Zuber, P.** (1992). Isolation and characterization of *sfp*: a gene that functions in the production of the lipopeptide biosurfactant, surfactin, in *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.* **232**, 313-321
- Naruse, N., Tenmyo, O., Kamei, H., Miyaki, T., Konishi, M., Oki, T.** (1990). Pumilacidin, a complex of new antiviral antibiotics. Production, isolation, chemical properties, structure and biological activity. *J. Antibiot.* **43**, 267-280
- Nishikiori, T., Naganawa, H., Muraoka, T., Aoyagi, T., Umezawa, H.** (1986). Plipastatins: New inhibitors of phospholipase A2, produced by *Bacillus cereus* BNG302-fF57. II. Structure of fatty acid residue and amino acid sequences. *J. Antibiot. (Tokyo)* **34**, 745-754
- Nissen, E., Vollenbroich, D., Pauli, G.** (1997). Application of surfactin for mycoplasma inactivation in virus stocks. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* **33**, 414-415
- Pavela-Vrancic, M., Pfeifer, E., van Liempt, H., Schäfer, H.-J., von Döhren, H., Kleinkauf, H.** (1994a). ATP binding in peptide synthetases: determination of contact sites of the adenine moiety by photoaffinity labeling of tyrocidine synthetase 1 with 2-azidoadenosine triphosphate. *Biochemistry* **33**, 6276-6283
- Pavela-Vrancic, M., Pfeifer, E., Schröder, W., von Döhren, H., Kleinkauf, H.** (1994b). Identification of the ATP binding site in tyrocidine synthetase 1 by selective modification with fluorescein 5'-isothiocyanate. *J. Biol. Chem.* **269**, 14962-14966
- Pavela-Vrancic, M., van Liempt, H., Pfeifer, E., Freist, W., von Döhren, H.** (1994c). Nucleotide binding by multienzyme peptide synthetases. *Eur. J. Biochem.* **220**, 535-542
- Pfeifer, E., Pavela-Vrancic, M., von Döhren, H., Kleinkauf, H.** (1995). Characterization of tyrocidine synthetase 1 (TY1): Requirement of posttranslational modification for peptide biosynthesis. *Biochemistry* **34**, 7450-7459
- Pfennig, F., Schauwecker, F., Keller, U.** (1999). Molecular characterization of the genes of actinomycin synthetase I and of a 4-methyl-3-hydroxyanthranilic acid carrier protein involved in the assembly of acylpeptide chain of actinomycin in *Streptomyces*. *J. Biol. Chem.* **274**, 12508-12516
- Quadri, L.E.N., Weinreb, P.H., Lei, M., Nakano, M.M., Zuber, P., Walsh, C.T.** (1998). Characterization of Sfp, a *Bacillus subtilis* phosphopantetheinyl transferase for peptidyl carrier protein domains in peptide synthetases. *Biochemistry* **37**, 1585-1595

- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.** (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2 Auflage, Cold Spring Harbor laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Schlumbohm, W., Stein, T., Ullrich, C., Vater, J., Krause, M., Marahiel, M.A., Kruff, V., Wittmann-Liebold, B.** (1991). An active serine is involved in covalent substrate amino acid binding at each reaction center of gramicidin S synthetase. *J. Biol. Chem.* **266**, 23135-23141
- Schneider, A., Marahiel, M.A.** (1998). Genetic evidence for a role of thioesterase domains, integrated in or associated with peptide synthetases, in non-ribosomal peptide biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *Arch. Microbiol.* **169**, 404-410
- Schreiber, S.L., Crabtree, G. R.** (1992). The mechanism of action of cyclosporin A and FK 506. *Immunology Today* **13**, 136-142
- Shaw-Reid, C.A., Kelleher, N.L., Losey, H.C., Gehring, A.M., Berg, C., Walsh, C.T.** (1999). Assembly line enzymology by multimodular nonribosomal peptide synthetases: the thioesterase domain of *E. coli* -EntF catalyzes both elongation and cyclolactonization. *Chem. Biol.* **6**, 385-400
- Stachelhaus, T., Marahiel, M.A.** (1995). Modular structure of genes encoding multifunctional peptide synthetases required for non-ribosomal peptide synthesis. *FEMS Microbiol. Lett.* **125**, 3-14, 1995.
- Stachelhaus, T., Hüser, A., Marahiel, M.A.** (1996). Biochemical characterization of peptidyl carrier protein (PCP), the thiolation domain of multifunctional peptide synthetases. *Chemistry and Biology* **3**, 913-921
- Stachelhaus, T., Mootz, H.D., Bergendahl, V., Marahiel, M.A.** (1998). Peptide bond formation in nonribosomal peptide biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **273**, 22773-22781
- Stein, T., Vater, J.** (1996). Amino acid activation and polymerization at modular multienzymes in nonribosomal peptide biosynthesis. *Amino Acids* **10**, 201-227
- Stein, T., Kluge, B., Vater, J., Franke, P., Otto, A., Wittmann-Liebold, B.** (1995). Gramicidin S synthetase 1 (phenylalanine racemase), a prototype of amino acid racemases containing the cofactor 4'-phosphopantetheine. *Biochemistry* **34**, 4633-4642
- Stein, T., Vater, J., Kruff, V., Wittmann-Liebold, B., Franke, P., Panico, M., McDowell, R., Morris, H.R.** (1994). Detection of 4'-phosphopantetheine at the thioester binding site for L-valine of gramicidin S synthetase 2. *FEBS Lett.* **340**, 39-44

- Stein, T., Vater, J., Kruft, V., Otto, A., Wittmann-Liebold, B., Franke, P., Panico, M., McDowell, R., Morris, H.R.** (1996). The multiple carrier model of nonribosomal peptide biosynthesis at modular multienzymatic templates. *J. Biol. Chem.* **271**, 15428-15435
- Stemple, C.J., Davis, M.A., Hynes, M.J.** (1998) The *facC* gene of *Aspergillus nidulans* encodes an acetate-inducible carnitine acetyltransferase. *J. Bacteriol.* **180**, 6242-6251
- Thomas, D.W., Ito, T.** (1969). The revised structure of the peptide antibiotic esperin, established by mass spectrometry. *Tetrahedron Lett.* **25**, 1985-1990
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J.** (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673-4680
- Triglia, T., Peterson, M.G., Kemp, D.J.** (1988). A procedure for *in vitro* amplification of DNA segments that lie outside the boundaries of known sequences. *Nucleic Acids Res.* **16**, 8186
- Tsukagoshi, N., Tamura, G., Arima, K.** (1970). A novel protoblast-bursting factor (surfactin) obtained from *Bacillus subtilis* IAM 1213. I. The effects of surfactin on *Bacillus megaterium* KM. *Biochem. Biophys. Acta* **196**, 204-210
- Turgay, K., Krause, M., Marahiel, M.A.** (1992). Four homologous domains in the primary structure of GrsB are related to domains in a superfamily of adenylate-forming enzymes. *Mol. Microbiol.* **6**, 529-546
- Ullrich, C.** (1991). Untersuchung zur Biosynthese des Lipopeptids Surfactin aus *Bacillus subtilis*. Dissertation, Technische Universität Berlin
- Ullrich, C., Kluge, B., Palacz, Z., Vater, J.** (1991). Cell-free biosynthesis of surfactin, a cyclic lipopeptide produced by *Bacillus subtilis*. *Biochemistry* **30**, 6503-6508
- Umezawa, H., Aoyagi, T., Nishikiori, T., Okuyama, A., Yamagishi, Y., Hamada, M., Takeuchi, T.** (1986). Plipastatins: new inhibitors of phospholipase A₂, produced by *Bacillus cereus* BMG302-fF67. I. Taxonomy, production, isolation and preliminary characterization. *J. Antibiot. (Tokyo)* **39**, 737-744
- Vater, J.** (1986). Lipopeptides, an attractive class of microbial surfactants. *Progr. Colloid Polym. Sci.* **72**, 12-18
- Vater, J., Mallow, N., Gerhardt, S., Gadow, A., Kleinkauf, H.** (1985). Gramicidin S synthetase. Temperature dependence and thermodynamic parameters of substrate amino acid activation reactions. *Biochemistry* **24**, 2022-2027
- Vater, J., Stein, T., Vollenbroich, D., Kruft, V., Wittmann-Liebold, B., Franke, P., Liu, L., Zuber, P.** (1997). The modular organization of multifunctional peptide synthetases. *J. Protein Chem.* **16**, 557-564

- Vining, L.C.** (1990). Function of secondary metabolites. *Annu. Rev. Microbiol.* **44**, 395-427
- Vollenbroich, D., Kluge, B., D'Souza, C., Zuber, P., Vater, J.** (1993). Analysis of a mutant amino acid-activating domain of surfactin synthetase bearing a serine-to-alanine substitution at the site of carboxylthioester formation. *FEBS* **325**, 220-224
- Vollenbroich, D., Metha, N., Zuber, P., Vater, J., Kamp, R.M.** (1994). Analysis of surfactin synthetase subunits in *urfA* mutants of *Bacillus subtilis* OKB105. *J. Bacteriol.* **176**, 395-400
- Vollenbroich, D.** (1996). Biosynthese und biotechnologische Anwendungen des Lipopeptids Surfactin aus *Bacillus subtilis*. Dissertation, Technische Universität Berlin
- Vollenbroich, D., Pauli, G., Özel, M., Vater, J.** (1996). Antimycoplasma properties and application in cell culture of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 44-49
- Vollenbroich, D., Özel, M., Vater, J., Kamp, R.M., Pauli, G.** (1997). Mechanismen of inactivation of enveloped viruses by the biosurfactant surfactin from *Bacillus subtilis*. *Biologicals* **25**, 289-297
- Walker, J.E., Abrahams, E.P.** (1970). The structure of bacilysin and other products of *Bacillus subtilis*. *Biochem. J.* **118**, 563-570
- Wehland, M.** (1996). Reinigung und Charakterisierung von Acyltransferasen bei der Biosynthese von Surfactin in *Bacillus subtilis*. Diplomarbeit, Technische Universität Berlin
- Weinreb, P.H., Quadri, L.E.N., Walsh, C.T., Zuber, P.** (1998). Stoichiometry and specificity of *in vitro* phosphopantetheinylation and aminoacylation of the valine-activating module of surfactin synthetase. *Biochemistry* **37**, 1575-1584
- Winkler, F.K., D'Arcy, A., Hunziker, W.** (1990). Structure of human pancreatic lipase. *Nature* **343**, 771-774
- Zuber, P., Nakano, M.M., Marahiel, M.A.** (1993). Peptide antibiotics, in *Bacillus subtilis* and other Gram-positive bacteria. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 897-916

Danksagung

Für die Möglichkeit, am Max-Volmer-Institut für biophysikalische Chemie und Biochemie, Fachgebiet Biochemie und Molekulare Biologie, diese Arbeit durchführen zu können, bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Johann Salnikow

Ich möchte Herrn Priv.-Doz. Dr. Joachim Vater dafür danken, daß er mir die Mittel, den Arbeitsplatz und seine Diskussionsbereitschaft zur Verfügung gestellt hat, um diese Dissertation durchführen zu können.

Ohne die stetige Hilfe und Diskussionsbereitschaft aller Mitglieder der Arbeitsgruppe von Herrn Priv.-Doz. Dr. Joachim Vater wäre die erfolgreiche Durchführung dieses Projektes nicht möglich gewesen.

Ich danke Herrn Dr. Frank Bernhard für die Plasmide des Glutaminsäure-aktivierenden Moduls, die er mir zur Verfügung gestellt hat. Herrn Prof. Dr. Georg Pauli danke ich für die Möglichkeit am Robert Koch-Institut die DNA-Sequenzierungen unter der engagierten Betreuung von Herrn Siegfried Pociuli anfertigen zu können und Herrn Dr. Peter Franke für die Möglichkeit und Unterstützung bei den massenspektrometrischen Messungen. Bei Frau Gisela Haeselbarth bedanke ich mich für die Protein-Sequenzierung und bei Frau Eva Denaro für die schnelle und gute Photoarbeit.

Ein besonderer Dank an all meine Freunde, die in dieser nicht immer leichten Zeit all meine Launen ertrugen und die Freundschaft nicht aufgekündigten.

Lebenslauf

Name, Vorname	Sokoll, Andrea
Geburtsdatum	31.12.1962
Geburtsort	Hamburg
1969-1973	Volksschule Fährstr. 90, Hamburg
1973-1981	Gymnasium Wilhelmsburg, Hamburg
1984-1987	Besuch der Abendschule „Brecht Akademie“
24.04.1987	Abitur
01.04.1988	Immatrikulation im Studiengang Biochemie am Fachbereich Chemie der Freien Universität Berlin
01.09.1995	Abschluß als Dipl.-Biochemikerin Diplomthema: Funktion verschiedener Domänen des Signalpeptids des humanen Immundefizienzvirus 1 (HIV-1) Hüllproteins
1996-1999	Anfertigung der vorliegenden Dissertation