Herstellung und heterologe Expression neukombinierter Gene nichtribosomaler Peptidsynthetasen (NRPS) aus Streptomyces unter Einbeziehung katalytischer Domänen aus Bacillus und funktionelle Charakterisierung ihrer Genprodukte

> vorgelegt von Diplom-Chemiker Manuel Lang aus Berlin

von der Fakultät II – Mathematik und Naturwissenschaften der Technischen Universität Berlin zur Erlangung des akademischen Grades Doktor der Naturwissenschaften Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender: Berichter: Berichter: Prof. Dr. T. Friedrich Priv.-Doz. Dr. U. Keller Prof. Dr. R. Süssmuth

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 3. Mai 2007

Berlin 2007

D 83

Abstract

The mechanism of nonribsomal peptide synthetases (NRPS) implies activation and condensation of specific amino acids in an assembly line-like fashion. NRPS assembly lines consist of modules each recruiting one individual amino acid. The number of modules and their sequential order in a given NRPS system determine the number and sequence of amino acids in the peptide product. New combinations of modules from bacillary NRPS obtained by gene fusions using defined fusion points in the hinge regions between catalytic domains where previously shown to catalyse formation of new compounds in vitro. To address the structure-activity relationships in NRPS modules from high G+C organisms like Streptomyces, bi- and trimodular NRPS genes were constructed from modules of the actinomycin synthetases (ACMS) system from Streptomyces chrysomallus. The directly fused ACMS I and AcmACP served as initiation module, to which downstream one or two elongation modules from the peptide synthetases ACMS II and/or ACMS III were attached. Heterologous expression of the corresponding gene constructs in S. lividans yielded functional active enzymes catalysing formation of covalently bound aroyl-mono and -dipeptids. Additional presence of release domains (Te-domains) taken from a bacillary NRPS system or from the ACMS system at the carboxyterminus of recombinant NRPS greatly stimulated release of peptide products from enzymes which enabled to follow product formation in vivo upon feeding of suitable substrates for the initiation module. Promoter analyses of ACMS genes in Streptomyces chrysomallus revealed that their expression is controlled in a growth-linked manner from promoters with typical sigma70 consensus from E. coli or Streptomyces. Expression of recombinant trimodular NRPS-constructs in a foreign Streptomyces under control of the ACMS promoters gave optimal yields in both enzyme level and peptide product in vivo.

The data indicate the feasibility of interdomain gene fusions to obtain active multifunctional hybrid NRPS with the potential to form new compounds. Development of an expression system using the ACMS promoters proved to be highly suitable for heterologous expression of such gene constructs in foreign *Streptomyces*.

Inhaltsverzeichnis

	Abstract	III
	Inhaltsverzeichnis	IV
	Abbildungsverzeichnis	IX
	Tabellenverzeichnis	XII
	Abkürzungsverzeichnis	XIII
1	Einleitung	1
1.1	Die nichtribosomale Peptidsynthese	1
1.1.1	Der Aufbau von Peptidsynthetasen	2
1.1.2	Der Mechanismus der nichtribosomalen Peptidsynthese	3
1.1.3	Die Initiation der nichtribosomalen Peptidsynthese	6
1.1.4	Die Termination der nichtribosomalen Peptidsynthese	6
1.1.5	Wirkungsmechanismus von zusätzlichen NRPS-Domänen	7
1.1.6	Konservierte Motive von Peptidsynthetasen (Core-Motive)	10
1.2	Polyketidsynthasen des Typs I: NRPS-verwandte Systeme	11
1.2.1	Aufbau der Polyketidsynthasen des Typ I	12
1.2.2	Mechanismus der Polyketidsynthese	12
1.2.3	Die Initiation der Polyketidsynthese	13
1.2.4	Die Termination der Polyketidsynthese	13
1.2.5	Wirkungsmechanismus von Extradomänen	13
1.2.6	Hybride NRPS-PKS-Systeme	15
1.3	Die Biosynthese der Actinomycine	16
1.4	Rekombinante NRPS-Systeme	18
1.5	Zielsetzung der Arbeit	22
2	Materialien	24
2.1	Mikroorganismen	24
2.2	Vektoren und Plasmide	24
2.3	Oligonucleotide und Nucleinsäuren	24
2.3.1	PCR-Primer	24
2.3.2	Primer für primer-extension-Experimente	25
2.3.3	Nucleinsäuren	25
2.4	Nährmedien	25
2.5	Puffer und Lösungen	27
2.5.1	Puffer für die Proteinpräparation	27

2.5.2	Weitere Puffer und Lösungen	27
2.6	Radiochemikalien	28
2.7	Feinchemikalien	28
2.8	Enzyme und Kits	29
2.9	Säulenmaterialien	29
2.10	Geräte und sonstige Materialien	29
2.11	Software	29
2.12	Datenbank-Referenzen	30
3	Methoden	31
3.1	Methoden im Umgang mit Nucleinsäuren	31
3.1.1	Agarose-Gelelektrophorese	31
3.1.2	Eluierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	31
3.1.3	Polymerase-Chain-Reaction (PCR)	31
3.1.4	Präparation von Plasmid-DNA aus Streptomyceten	32
3.1.5	Präparation von Plasmid-DNA aus E. coli	32
3.1.6	Präparation von chromosomaler bakterieller DNA	33
3.1.7	Ligation von DNA-Fragmenten	33
3.1.8	DNA-Sequenzierungen	33
3.1.9	Präparation bakterieller gesamt RNA	34
3.1.10	Primer-Extension Experimente	35
3.2	Klonierung der eingesetzten Plasmide	35
3.2.1	Vektorsysteme für die Expression von NRPS-Genkonstrukten in	35
	Streptomyces	
3.2.2	Klonierung von pACM46	37
3.2.3	Klonierung von pACM47	37
3.2.4	Klonierung von pACM48	38
3.2.5	Klonierung von pACM54	38
3.2.6	Klonierung von pACM50	38
3.2.7	Klonierung von pACM55	39
3.2.8	Klonierung von pACM56	40
3.2.9	Klonierung von pACMA1FUS002	40
3.2.10	Klonierung von pACM45	40
3.2.11	Klonierung von pACM53	41
3.2.12	Klonierung von pIOACM53	41
3.2.13	Klonierung von pJMLACM1	41

V

3.2.14	Klonierung von pJMLACM2	42
3.2.15	Klonierung von pJMLACM5	42
3.2.16	Klonierung von pJMLMyx-1	42
3.2.17	Klonierung von plOacmA	43
3.2.18	Klonierung von plOacmB	44
3.3	Umgang mit Mikroorganismen	45
3.3.1	Kultivierung von Streptomyces sp.	45
3.3.2	Kultivierung von E. coli	45
3.3.3	Transformation von E. coli	46
3.3.4	Transformation von Streptomyces sp.	46
3.3.5	Präparation transformations-kompetenter E. coli-Zellen	47
3.2.6	Kurzzeitfütterungsexperimente zur Untersuchung auf in-vivo-	47
	Produktbildung	
3.4	Proteinchemische Arbeitsmethoden	48
3.4.1	Proteingehaltsbestimmung	48
3.4.2	SDS-Gelelektrophorese	48
3.4.3	Western-Blot-Analysen	49
3.4.4	Bestimmung der Enzymaktivität durch Thioester-Bildung	49
3.4.5	Bestimmung der Enzymaktivität durch die substratabhängige	50
	ATP/[³² P]-PP _i -Austauschreaktion	
3.4.6	Herstellung von Zellextrakten	50
3.4.7	PEI-Fällung	51
3.4.8	Ammoniumsulfatfällung	51
3.4.9	Chromatographische Trennungsverfahren	51
3.4.10	Trennungsgang zur Proteinpräparation von multimodularen	53
	rekombinanten Peptidsynthetasen nach heterologer Expression der	
	kodierenden Gene in S. lividans	
3.4.11	Trennungsgang zur Quantifizierung von Enzymaktivitäten der	54
	Actinomycinsynthetasen in S. chrysomallus und S. lividans/plOacmA	
3.4.12	Trennungsgang zur Quantifizierung der Aktivitäten plasmid- und	54
	chromosomal kodierter ACMSI in S. chryosmallus / plOacmA	
3.4.13	Untersuchung von ACM46 auf Epimeraseaktivität	54
3.4.14	Untersuchung von ACM44-56 auf Produktbildung und	55
	Thioesteraseaktivität	
3.4.15	Untersuchung von ACM53 auf Produktbildung und	55

VI

VII

Thioesteraseaktivität

3.4.16	Untersuchung von ACMA1FUS002 und ACMSII auf Produktbildung	56
3.4.17	Untersuchung von ACM45 auf Produktbildung	56
3.4.18	Untersuchung von JMLMyx-1 auf Produktbildung	57
3.5	Analysemethoden für kurzkettige Peptide	57
3.5.1	Dünnschichtchromatographie	57
3.5.2	Identitätsnachweis für das Aroyldipeptid durch HPLC-Analyse	57
3.5.3	Quantifizierung DC-gebundener Produktmengen	58
4	Ergebnisse	59
4.1	Rekombinante Derivate der Actinomycinsynthetasen mit fusionierten	59
	Thioesterasedomänen	
4.1.1	Konstruktion und Testung von ACM46 zur Validierung des gewählten	61
	EcoRI-Fusionspunktes	
4.1.2	Konstruktion und Testung von ACM47	63
4.1.3	Konstruktion und Testung von ACM48	64
4.1.4	Konstruktion und Testung von ACM54	65
4.1.5	Testung von ACM44	68
4.1.6	Konstruktion und Testung von ACM50	69
4.1.7	Konstruktion und Testung von ACM55	71
4.1.8	Konstruktion und Testung von ACM56	72
4.1.9	Vergleichende quantitative Analyse der Synthetasen ACM46-56 und	73
	ihrer Produktbildungsraten	
4.2	Konstrukte mit integralen Initiationsmodulen	76
4.2.1	Ein Di-Domänen Initiationsmodul (ACMA1FUS002)	76
4.2.2	Ein fusioniertes Initiationsmodul (ACM45)	77
4.3	Eine rekombinante Peptidsynthetase mit Befähigung zum	79
	Produktumsatz (ACM53)	
4.3.1	Konstruktion und in vitro-Testung von ACM53	81
4.3.2	In vivo – Testung von ACM53	81
4.3.3	Expression von acm53 unter Kontrolle des acmA-Promotors	82
4.3.4	Kurzzeit-Fütterungsexperimente unter Zusatz verschiedener Aryl-	82
	Carbonsäuren	
4.4	Untersuchungen der Substratspezifität der C-Domänen von ACMSIII-	83
	MeVal- und ACMSII-(D)-Val-Modul	
4.4.1	Analyse der Anwendung des A-T-Fusionspunktes auf die Beladung	86

	der T-Domäne im Thr-Modul der ACMSII	
4.4.2	JMLACM5, ein trimodulares Enzym mit N-Methyl-Aminosäure-	88
	spezifischer C-Domäne	
4.5	NRPS-PKS-Hybridsynthetase JMLMyx-1	90
4.6	Untersuchungen an den Promotoren der	94
	Actinomycinsynthetasegene aus S. chrysomalus	
4.6.1	Kartierung der Promotoren der Actinomycinsynthetasegene	94
4.6.2	Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes des acmA-Gens	95
4.6.3	Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes des acmB-Gens	96
4.6.4	Transkriptionelle Analyse von acmA und acmB in Streptomyces	96
	chrysomallus	
4.6.5	Analyse der Promotoren der acm-Gene	97
4.6.6	Einfluss von Kohlenstoffquellen auf die Actinomycinproduktion von S.	101
	chrysomallus	
4.6.7	Vegetative Expression der acm-Synthetasegene in S. chrysomallus	103
4.6.8	Expression des acmA-Gens in S. lividans	103
4.6.9	Vergleich der spezifischen ACMSI-Aktivitäten in S. chrysomallus und S.	104
	lividans (plOacmA)	
4.6.10	Verwendung des acmA-Promotors zur Expression von rekombinanten	105
	NRPS-Genen in S. lividans	
5	Diskussion	107
5.1	Stand der Forschung und Zielsetzung	107
5.2	Rekombinante Peptidsynthetasen auf Grundlage der Actinomycin-	108
	Synthetasen aus Streptomyces chrysomallus	
5.3	Konstrukte mit fusionierten Te-Domänen	109
5.4	Fusionen am und im Initiationsmodul der Actinomycinsynthetasen (A-	112
	T-Fusionen, T-C-Fusionen)	
5.5	Zusammenführung von Initiations-, Elongations- und	115
	Terminationsmodulen auf einer Peptidsynthetase	
5.6	A-T-Fusionierung zum Erstellen eines rekombinanten NRPS/PKS-	116
	Hybridenzyms	
5.7	Untersuchungen an den acm-Promotoren	118
6	Literatur	122

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1	Strukturformeln einiger Naturstoffe, die unter Beteiligung von	1
		2
ADD. 1.1.1-1	Aligemeiner Aufdau einer Peptiasynthetase bzw. eines Ensembles von Peptidsynthetasen	3
Abb. 1.1.2-1	Die durch die A-Domäne katalysierte Adenylierung der	4
	Substrataminosäure	
Abb. 1.1.2-2	Überführung des Substrataminosäure-AMP-Anhydrides in einen Thioester	4
Abb. 1.1.2-3	Schematische Darstellung der posttranslationellen Modifizierung einer T-	5
	Domäne	-
Abb. 1.1.2-4	Schematische Darstellung der durch die C-Domäne katalysierten	5
	Peptidkettenelongation	
Abb. 1.1.5-1	Schematische Darstellung der Peptidkettenelongation durch	8
	Cyclokondensation	
Abb. 1.1.5-2	Generierung struktureller Diversität durch Peptidsynthetasen am Beispiel	9
	der NRPS-assembly lines des Bacitracins und des Cylcosporins	
Abb. 1.1.6-1	Die Lage der hochkonservierten Sequenzmotive (Core-Motive) von NRPS-	10
	Modulen am Beispiel des D-Valin-Moduls der ACMSII und des N-Methyl-	
	Valin-Moduls der ACMSIII	
Abb. 1.2-1	Beispielstrukturen für Naturstoffe, die unter Mitwirkung von PKS II bzw. PKS I	11
	gebildet werden	
Abb. 1.2.5-1	Allgemeiner Aufbau einer PKSI und Wirkungsweise der "reduktiven	14
	Schleife" aus KR-, DH- und ER-Domäne	
Abb. 1.2.5-2	Die drei Megasynthetasen des Erythromycin-PKS-Systems (DEBS)	15
Abb. 1.3-1	Biosynthese des 4-MHA-Pentapeptids durch die Actinomycinsynthetasen	16
Abb. 1.3-2	Bildung von Actinomycin durch oxidative Dimerisierung zweier	16
	"Actinomycinhalbmoleküle" (4-MHA-Pentapeptidlaktone)	
Abb. 1.3-3	Die Anordnung der Peptidsynthetasegene im	18
	Actinomycinbiosynthesegencluster von Streptomyces chrysomallus	
Abb. 1.4-1	Produktion eines verkürzten 6-Desoxyerythronolid-Derivates durch die	19
	rekombinante Polyketidsynthase DEBS1-Te	
Abb. 1.4-2	Rekombinantes NRPS-System nach Scheider et al. (1998)	20
Abb. 1.4-3	Rekombinante Surfactin-NRPS-assembly line zur Produktion eines	21
	verkürzten Surfactin-Derivates	
Abb. 1.4-4	Rekombinante Surfactin-NRPS-assembly line zur Produktion eines	21
	Surfactin-Derivates nach Yakimov et al. (2000)	
Abb. 3.2.1-1	Restriktionskarten der Plasmide plJ702 und pSP72 sowie der von ihnen	36
	abgeleiteten shuttle-Plasmide pSPIJ004 und pSPIJ005	
Abb. 3.2.17-1	Herleitung des Promotor-Testkonstrukte plOacmA und lOacmArev	44
Abb. 3.3.9-1	Protein- und Aktivitätsprofil bei der Gelfiltration von ACM46 an AcA34	52
Abb. 3.5.3-1	Eichkurve für den 14C-Detektor	58
Abb. 4.1-1	Auszug aus einem Alignment des Überganges von Thiolierungsdomänen	60

Х

	zur jeweils nachfolgenden Domäne	
Abb. 4.1.1-1	Bildung von Threonyl-(D,L)-Valin durch ACMSII und ACM46	62
Abb. 4.1.1-2	Zellfreie Synthese von p-Toluyl-Theonyl-Valin durch ACMSI, AcmACP und	62
	ACM46	
Abb. 4.1.2-1	Konstruktion von ACM47	63
Abb. 4.1.2-2	Zellfreie Synthese von p-Toluyl-Threonyl-Valin durch ACMSI, AcmACP und	64
	ACM47	
Abb. 4.1.3-1	Konstruktion von ACM48	65
Abb. 4.1.3-2	Zellfreie Synthese von p-Toluyl-Threonyl-Valin durch ACMSI, AcmACP und	65
	ACM48	
Abb. 4.1.4-1	Konstruktion und Testung von ACM54	67
Abb. 4.1.5-1	Konstruktion von ACM44	68
Abb. 4.1.5-2	Zellfreie Synthese von p-Toluyl-Thr-Val durch ACMSI, AcmACP und	69
	ACM44	
Abb. 4.1.6-1	Konstruktion ACM50	69
Abb. 4.1.6-2	Zellfreie Synthese von p-Toluyl-Thr-Val durch ACMSI, AcmACP und ACM50	70
Abb. 4.1.6-2	Autoradiogramme der dünnschichtchromatographischen Auftrennung	70
	der Extrakte bei Inkubation von ACMSI, AcmACP und ACM50 in	
	Gegenwart und Abwesenheit von AdoMet	
Abb. 4.1.7-1	Konstruktion von ACM55	71
Abb. 4.1.7-2	Zellfreie Synthese von p-Toluyl-Thr-Val durch ACMSI, AcmACP und ACM55	72
Abb. 4.1.8-1	Konstruktion von ACM56	72
Abb. 4.1.8-2	Zellfreie Synthese von p-Toluyl-Threonyl-Valin durch ACMSI, AcmACP und ACM56	73
Abb. 4.1.9-1	Expressionskonstrukte zur heterologen Expression der rekombinanten NRPS-Gene <i>acm</i> 46-56 und Präparationen der Peptidsynthetasen ACM46- 56	73
Abb. 4.2.1-1	Alignment der A-T-Übergänge innerhalb der modularen	77
	Peptidsynthetasen des Actinomycinclusters mit dem durch Fusionierung	
	von ACMSI und AcmACP entstandenen A-T-Übergang in der	
	rekombinanten Peptidsynthetase ACMA1FUS002	
Abb. 4.2.1-1	Konstruktion und Testung ACMA1FUS002	77
Abb. 4.2.2-1	Alignment der Modul-Modul-Übergänge zwischen dem fusionierten	78
	Loader-Modul (ACM45_M1) mit Modul-Modul-Übergängen in ACMSII und ACMSIII.	
Abb. 4.2.2-2	Zellfreie Synthese von p-Toluyl-Thr-Val durch ACM45	78
Abb. 4.3.1-1	Konstruktion und in vitro-Testung ACM53	79
Abb. 4.3.1-2	Bestimmung der Geschwindigkeit der Produktbildung an ACM53 in	80
	Abhängigkeit von der Konzentration des Valins im in vitro-Assay	
Abb. 4.3.2-1	Autoradiogramm der DC-Auftrennung eines Extraktes von S. lividans/pACM53 nach 90 min Inkubation des Mycels mit 14C-markierten	81

	Aminosäuren	
Abb. 4.3.4-1	In-vivo-Produktbildung durch S. lividans / pIOACM53 nach Zufütterung	83
	verschiedener Aryl-Carbonsäuren	
Abb. 4.4-1	Auszug aus einem Alignment des Übergangsbereiches zwischen	85
	Adenylierungs- und Thiolierungsdomänen in Modulen bakterieller NRPS-	
	Cluster	
Abb. 4.4.1-1	Konstruktion und Testung JMLACM2	87
Abb. 4.4-1.2	Zeitverlauf der Selbstbeladung von JMLACM2 und ACMSII mit Threonin	87
Abb. 4.4.2-1	Konstruktion von JMLACM5	88
Abb. 4.4.2-2	Kurzzeit-Fütterungsexperimente von S. lividans transformiert mit	89
	pIOACM53 bzw. pJMLACM5	
Abb. 4.5-1	Genetische Organisation des Myxothiazol-Biosynthesegenclusters	90
Abb. 4.5-2	Konstruktion von JMLMyx-1	91
Abb. 4.5-3	Präparation und Testung JMLMyx-1	92
Abb. 4.6.1-1	Expression von acmA und acmB in S. lividans unter Kontrolle ihrer eigenen	95
	Promotoren	
Abb. 4.6.2-1	Kartierung der Transkriptionsstartpunkte der acm-Gene durch primer-	96
	extension	
Abb. 4.6.5-1	Alignment der acm-Promotoren mit Streptomyces-Promotoren carbon-	98
	katabolitreprimierter Gene, dem veg-Promotor aus Bacillus subtilis und	
	dem E. coli-Konsensus für 🕫 abhängige Promotoren	
Abb. 4.6.5-2	Nucleotidsequenz der intercistronischen Region zwischen den Genen	100
	acmA und acmB	
Abb. 4.6.6-1	Wachstumskurven von S. chrysomallus SCI in Minimal- und Vollmedium	102
	unter Supplementierung mit Glucose oder Maltose	
Abb. 4.6.8-1	Kultivierung von S. lividans TK24 / plOacmA in Medium S unter Glucose-	104
	oder Maltose-Supplementierung	
Abb. 4.6.10-1	Expression von acm53 unter Kontrolle des acmA-Promotors	106
Abb. 5.4.1-1	Aryl-Carbonsäure-aktivierende Initiationsmodule verschiedener NRPS-	113
	bzw. PKS-Biosynthesesysteme	

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.3-1	Übersicht über die Actinomycinsynthetasen		
Tabelle 2.12-1	Auflistung der in den multiplen Alignments wiedergegebenen	30	
	Proteinsequenzen		
Tabelle 3.1.3	PCR-Reaktionen und Temperaturprogramme	32	
Tabelle 3.3.6-1	Konzentrationen der bei Kurzzeitfütterungsexperimenten zugesetzten	49	
	Aryl-Carbonsäuren		
Tabelle 3.3.9-1	ATP-abhängige Thioesterbildung nach Fraktionierung eines	53	
	Proteinextraktes aus S. lividans/pIOACM46		
Tabelle 4.1.9-1	Quantifizierung der Enzymaktivität in den Präparationen der	74	
	rekombinanten Peptidsynthetasen ACM44-56 und der initialen		
	Produktbildungsgeschwindigkeiten		
Tabelle 4.1.9-2	Abgeleitete Maximalgeschwindigkeiten v_{max} und Umsatzraten K_{cat} an	75	
	den rekombinanten Peptidsynthetasen ACM44-56		
Tabelle 4.6.6-1	inverted und directed repeats mit putativer regulatorischer Funktion im	98	
	Bereich der <i>acm</i> -Promotoren		
Tabelle 4.6.5-2	Putative Operatorsequenzen mit Ähnlichkeit zu amyO	99	

Abkürzungsverzeichnis

4'-PPant	4'-Phosphopantethein
4-MHA	4-Methyl-3-hydroxyanthranilsäure
ACM	Actinomycin
ACMS	Actinomycin-Synthetase
ACP	Acyl-Carrier-Protein
A-Domäne	Adenylierungsdomäne
AdoMet	S-Adenosyl-Methionin
AMP	Adenosinmonophosphat
AS	Aminosäure(n)
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-Indoyl-Phosphat
BSA	Rinderserumalbumin
C-Domäne	Kondensationsdomäne
Ci	Curie (1 Ci = 3,7 · 10 ¹⁰ Bq)
СоА	Coenzym A
cpm	Counts per minute
DC	Dünnschichtchromatographie
DEAE	O-2-Diethylaminoethyl
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	destilliert
DTE	1,4-Dithioerythritol
E-Domäne	Epimerase-Domäne
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EE	Essigsäureethylester
f.c.	finale Konzentration
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kDa	Kilodalton
KS	Ketosynthetase
Lsg.	Lösung
NBT	Nitro Blue Tetrazolium
Ni-NTA	Nickel-Nitrilo-Tri-Acetic acid
NRPS	Nichtribosomale Peptidsynthetase
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

PEG	Polyethylenglycol
PKS	Polyketidsynthase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPi	Pyrophosphat
PPTase	4'-Phosphopantetheinyl-Transferase
rpm	Rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natrium-n-Dodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
T-Domäne	Thiolierungsdomäne
Te-Domäne	Thioesterasedomäne
TEMED	N,N,N',N'Tetramethylethylendiamin
TES	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TFA	Trifluoressigsäure
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Vol.	Volumen

1. Einleitung

Eine große und strukturell diverse Gruppe von Naturstoffen wird durch Kondensation von Acyl-Monomeren an modular organisierten Megasynthetasen gebildet, wobei Peptidstrukturen an nichtribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS) und Ketidstrukturen an Polyketidsynthasen (PKS) entstehen. Einige Beispiele für Naturstoffe, die unter Mitwirkung von NRPS gebildet werden, sind in Abb. 1-1 gezeigt (Beispiele für Strukturen von PKS-Produkten sind in Abb. 1.2-1 zu finden).



Abbildung 1-1: Strukturformeln einiger Naturstoffe, die unter Beteiligung von nichtribosomalen Peptidsynthetasen gebildet werden.

1.1 Die nichtribosomale Peptidsynthese

Unter den von Mikroorganismen gebildeten Naturstoffen findet sich eine Vielzahl von Peptiden und Peptidderivaten mit niedrigem Molekulargewicht. Vertreter dieser Substanzgruppe zeichnen sich häufig durch eine nicht-lineare, verzweigte Struktur sowie oft auch durch die Präsenz einer oder mehrerer nicht-proteinogener oder modifizierter Aminosäuren aus (Kleinkauf und von Döhren, 1996). Für viele niedermolekulare Peptid-Naturstoffe wurde festgestellt, dass sie nicht am Ribosom, sondern an produktspezifischen Enzymen synthetisiert werden. Diese Enzyme werden als nichtribosomale Peptidsynthetasen (Marahiel *et al.*, 1997, von Döhren *et al.*, 1997, Finking und Marahiel, 2004) bezeichnet. Es handelt sich in der Regel um sehr große (100 bis 1600 kDa), multifunktionale Enzyme, die modular organisiert sind. Die nichtribosomale Peptidsynthese erfolgt im Gegensatz zur ribosomalen Peptidsynthese unabhängig von einer sequenzdeterminierenden mRNA-Matrize, vielmehr ist hier die Sequenz des zu bildenden Peptides durch den modularen Aufbau der Peptidsynthetase vorgegeben. Peptidsynthetasen stellen somit nicht nur die zur Peptidsynthese benötigten katalytischen Funktionen bereit, sondern fungieren darüber hinaus auch als Protein-Matrize für ihr Produkt. Jedes Modul einer Synthetase ist für die Erkennung und den Einbau einer Aminosäure in die gebildete Peptidkette verantwortlich, wobei die Substrate zunächst kovalent an die Module gebunden und sodann miteinander kondensiert werden. Anzahl und Reihenfolge der Module eines NRPS-Systems entsprechen für gewöhnlich der Größe und Sequenz des gebildeten Peptides. Es wurden mittlerweile mehr als 300 Aminosäuren bzw. (Hydroxy-) Carbonsäuren identifiziert, die von Peptidsynthetasen als monomere Untereinheiten in nichtribosomal gebildete Peptide eingebaut werden (Konz und Marahiel, 1999).

1.1.1 Aufbau von Peptidsynthetasen

Peptidsynthetasen setzen sich aus repetitiven, hochkonservierten Einheiten, den Modulen, zusammen. Ein Modul besteht aus einem Ensemble individueller katalytischer Domänen. Die Reihenfolge dieser Domänen im Modul ist fast immer gleich. Man unterscheidet zwischen Initiations- und Elongationsmodulen. Ein Elongationsmodul besteht mindestens aus drei Domänen, einer Kondensations-, einer Adenylierungs- und einer Thiolierungsdomäne (C-, A- und T-Domäne). Der minimale Domänensatz eines Initiationsmodules besteht aus einer Adenylierungs- und einer Thiolierungsdomäne. T-Domänen werden in der Literatur häufig auch als PCP-Domänen (peptidyl carrier protein) bezeichnet. Da letztere Bezeichnung jedoch Peptid-Substrate für T-Domänen impliziert, während Chromopeptidin produzierenden NRPS-Systemen auch der Typ des ArCPs (aryl carrier protein) in der Funktion einer T-Domäne (mit Aryl-Carbonsäuren als Substrat) angetroffen wird, wird in dieser Arbeit der neutrale Begriff Thiolierungsdomäne verwendet.

Der kanonische Domänensatz eines Modules kann noch um zusätzliche Domänen erweitert sein. Beispiele für derartige accessorische Domänen sind Epimerase-, N-Methyltransferase- und Thioesterasedomänen. Cyclokondensationsdomänen stellen einen Sonderfall dar, da sie den kanonischen (C-, A, T-) Domänensatz nicht einfach

2

erweitern, sondern an die Stelle von C-Domänen treten. Abbildung 1.1.1-1 zeigt schematisch den Aufbau eines Systems von NRPS-Modulen (assembly line).



Abbildung 1.1.1-1: Allgemeiner Aufbau einer Peptidsynthetase bzw. eines Ensembles von Peptidsynthetasen. Die Domänen sind hier, wie in den folgenden schematischen Darstellungen von Peptidsynthetasen, als Rechtecke dargestellt, die entsprechend ihrer Funktion beschriftete sind: A = Adenylierungsdomäne, T = Thiolierungsdomäne, C = Kondensationsdomäne, Cy = Cyclokondensationsdomäne, M = N-Methyltransferasedomäne, E = Epimerasedomäne, T = Thioesterasedomäne. Initiations- und Terminations-Module können ebenso wie Elongationsmodule über zusätzliche Domänen verfügen, dies ist hier der Übersichtlichkeit halber nicht explizit dargestellt.

Die Module, die gemeinsam die Synthese eines Peptids bewirken, müssen nicht zwangsläufig auf einem gemeinsamen Protein vorliegen, vielmehr ist es bei bakteriellen Peptidsynthetase-Systemen oft so, dass die Module auf mehrere Proteine verteilt sind. Es können auch einzelne Domänen freistehen, d.h. als selbständige Proteine vorkommen.

1.1.2 Der Mechanismus der nichtribosomalen Peptidsynthese

Jedes Modul ist für die Aktivierung und Inkorporation einer individuellen Aminosäure in die zu bildende Peptidkette verantwortlich. Die Zahl, Abfolge und Spezifität der Module bestimmen die Größe, Sequenz und Zusammensetzung des Peptides (Kolinearitätsregel).

Die Elongation einer in Bildung befindlichen Peptidkette durch ein Modul setzt die katalytischen Aktivitäten, die auf den drei Domänen des kanonischen Domänensatzes beheimatet sind, voraus:

An der A-Domäne wird die Substrataminosäure erkannt und als Acyl- bzw. Aminoacyl-Adenylat aktiviert (Abb. 1.1.2-1).



Abbildung 1.1.2-1: Die durch die A-Domäne katalysierte Adenylierung der Substrataminosäure.

Die Substraterkennung durch die A-Domänen determiniert die Sequenz eines nichtribosomal gebildeten Peptides. Als Prototyp der A-Domäne gilt die Phenylalanin-aktivierende Adenylierungsdomäne der Gramicidin-Synthetase 1 (GrsA, PheA), deren Kristallstruktur bestimmt werden konnte (Conti *et al.*, 1997). Da für ein weiteres Mitglied der Superfamilie der Adenylat-bildenden Enyzme, die Luciferase, eine sehr ähnliche 3D-Struktur festgestellt wurde (Conti *et al.*, 1996), nimmt man für alle A-Domänen eine gleichartige Faltung an. Bei der Strukturaufklärung von PheA wurden die Aminosäurereste, die mit dem Substrat in Wechselwirkung treten, identifiziert. Durch Sequenzvergleich mit PheA ist es möglich, auch für A-Domänen, für die nur die Primärstruktur bekannt ist, die an der Substratbindung beteiligten Aminosäurepositionen zu identifizieren und Vorhersagen bezüglich der durch die betreffende A-Domäne aktivierten Verbindungen zu machen (Stachelhaus *et al.*, 1999, Challis *et al.*, 2000).

Im Zentrum einer T-Domäne befindet sich ein hochkonservierter Serin-Rest (Schlumbohm et al., 1991), der als Träger für eine prosthetische Gruppe, 4'-Phosphopantethein (4'-PPant), dient (Stein et al., 1994). 4'-PPant verfügt über eine endständige Sulfhydrylgruppe, auf welche die an der Adenylierungsdomäne als Aminoacyladenylat aktivierte Aminosäure unter Freisetzung von AMP und unter Ausbildung eines Aminoacyl-Thioesters übertragen wird (Abb. 1.1.2-2).



Abbildung 1.1.2-2: Überführung des Substrataminosäure-AMP-Anhydrides in einen Thioester. Die an die T-Domäne gebundene prosthetische Gruppe 4'-PPant ist hier in einer vereinfachten Form dargestellt, wie sie auch in folgenden Abbildungen verwendet wird. Die Strukturformel von 4'-PPant ist in Abb. 1.1.2-3 gezeigt.

Die Überführung der T-Domänen von der apo- in die holo-Form erfolgt durch 4'-Phosphopantethein-Transferasen (PPTasen) in einer Co-EnzymA-abhängigen Reaktion (Abb. 1.1.2-3).



Abbildung 1.1.2-3: Schematische Darstellung der posttranslationellen Modifizierung einer T-Domäne. Die 4'-PPant-Gruppe wird durch eine PPTase von CoenzymA auf eine Seryl-Seitenkette der T-Domäne übertragen. Die T-Domäne wird in der Abbildung nur durch diesen konservierten Serin-Rest des 4'-PPant-Bindungsmotives repräsentiert; für die holo-T-Domäne ist auch die vereinfachte Darstellung (grau hinterlegtes Insert) angegeben, die auch in den folgenden Abbildungen verwendet wird.

Die C-Domäne katalysiert die Bildung einer neuen Peptidbindung; dabei attackiert das an der T-Domäne des verlängernden Modules befindliche Aminoacyl-S-PPant-Nucleophil die an der T-Domäne des Vorgängermodules als Thioester aktivierte Peptidylkette (siehe Abb. 1.1.2-4).



Abbildung 1.1.2-4: Schematische Darstellung der durch die C-Domäne katalysierten Peptidkettenelongation. Gezeigt ist ein zwei Module umfassender Ausschnitt aus einer hypothetischen Peptidsynthetase. Die beiden dargestellten Module umfassen nur die kanonische Domänenabfolge CAT eines Elongationsmodules. Wie in den vorhergehenden Abbildungen sind auch hier die Domänen als Rechtecke dargestellt. Um die Domänen, die jeweils gemeinsam zu einem Modul gehören, kenntlich zu machen, sind diese in einer gemeinsamen Farbe unterlegt.

C-Domänen weisen eine hohe Selektivität für ihr Aminoacyl-Substrat und eine geringere Selektivität für ihr Peptidyl-Substrat auf (Belshaw *et al.*, 1999, Ehmann *et al.*, 2000). Nach dem Elongationsschritt ist die Peptidkette als Thioester an die carboxyterminale T-Domäne gebunden und steht zur Kettenelongation durch das nächste (in carboxyterminaler Richtung nachfolgende) Modul bereit. Bei der nichtribosomalen Peptidsynthese ist somit die wachsende Peptidkette immer in Form eines Thioesters an die Peptidsynthetase gebunden.

1.1.3 Die Initiation der nichtribosomalen Peptidsynthese

Die Initiation der Peptidsynthese erfolgt am aminoterminal lokalisierten Modul der assembly line. Zur Initiation der Peptidsynthese wird das Substrat durch die aktiviert des Initiationsmodules die Adenylierungsdomäne und auf Thiolierungsdomäne geladen. Ein Initiationsmodul hat in der Regel keine Kondensationsdomäne, da es als erstes Modul in der assembly line keine Peptidbindungsbildung katalysieren muss. Elongationsmodule sind in der Regel nicht zur Initiation der Peptidkettensynthese befähigt. Da ein Elongationsmodul der Tyrocidinsynthetase 2 (TycB) durch Deletion der C-Domäne in ein Initiationsmodul überführt werden konnte, wird vermutet, dass es die An- oder Abwesenheit einer C-Domäne ist, welche die Funktion eines Modules als Initiations- oder Elongationsmodul determiniert (Linne und Marahiel, 2000). Dies ist eventuell durch die Existenz einer Bindungsstelle (Donor-Bindungsstelle, Stein et al., 1996) innerhalb der C-Domäne zu erklären, die das an den 4'-PPant-Arm der zugehörigen T-Domäne gebundene Nucleophil gegenüber dem nachfolgenden Modul abschirmt.

1.1.4 Die Termination der nichtribosmalen Peptidsynthese

Nach dem letzten Elongationsschritt wird die an das letzte Modul gebundene Kette freigesetzt. Dies geschieht in der Regel durch spezielle C-terminal gelegene Domänen (Keating *et al.*, 2001). In den meisten bakteriellen NRPS-Systemen findet man am Carboxyterminus des letzten Modules eine Domäne mit Ähnlichkeit zu Thioesterasen (Thioesterase-Domäne, Te), die das gebildete Peptid durch Hydrolyse oder Cyclisierung freisetzt. Ebenso kann die Te-Domäne auch an einer Laktonisierung oder Cyclo-Oligomerisierung des Peptidproduktes beteiligt sein (Shaw-Reid *et al.*, 1999, Trauger *et al.*, 2000, Cao *et al.*, 2005).

In vielen NRPS-Genclustern ist außer der carboxyterminal am letzten NRPS-Modul befindlichen Te-Domäne noch das Gen einer eigenständigen Thioesterase (Te II) vorhanden. Experimentelle Befunde weisen darauf hin, dass die Te II vor allem mit der Hydrolyse von acetylierten 4'-PPant-Cofaktoren befasst sind (Schwarzer et al., 2002). Fehlbeladungen von T-Domänen mit Acetyl-Thioestern kommen eventuell dadurch zustande, dass die PPTasen bei der posttranslationellen Modifizierung der T-Domänen nicht zwischen CoA und Acetyl-CoA diskriminieren können.

Alternative Freisetzungsmechanismen für vollständige Peptidketten beruhen auf der Aktivität einer zumeist C-terminal fusionierten Reduktasedomäne oder einer zusätzlichen C-Domäne oder Cy-Domäne (Keating *et al.*, 2001). Einen Sonderfall stellt die Freisetzung von Ergotamin dar, das von der D-Lysergyl-Peptidsynthetase LPS1 durch Diketopiperazinbildung freigesetzt wird (Correia *et al.*, 2003).

1.1.5 Wirkungsmechanismus von zusätzlichen NRPS-Domänen

Die den kanonischen Domänensatz eines Modules erweiternden zusätzlichen Domänen wirken auf als Aminoacyl- oder Peptidyl-Thioester gebundende Zwischenprodukte ein. Wichtige Beispiele sind N-Methyl-Transferasedomänen, die in einer S-Adenosyl-Methionin-abhängigen Reaktion die Aminogruppe der Substrataminosäure methylieren. Diese N-Methylierung erfolgt auf der Aminoacyl-Stufe und somit vor der Bildung der Peptidbindung (Billich und Zocher, 1987). Epimerasedomänen epimerisieren Peptidyl-Thioester oder (wenn sie in einem Initiationsmodul situiert sind) Aminoacyl-Thioester am α -C-Atom und überführen die durch das jeweilige Modul eingebrachte Aminosäure von der L- in die D-Form (Stindl und Keller, 1994; Linne und Marahiel, 2000).

Eine Cyclokondensationsdomäne ist eine spezialisierte Kondensationsdomäne. Sie cyclokondensiert Threonin-, Serin- oder Cystein-Reste, die zuvor an ihren Aminogruppen acyliert wurden (die Acylierung wird dabei ebenfalls durch die Cyclokondensationsdomäne katalysiert). Die Cyclisierung erfolgt über ein Nucleophil der Seitenkette (-OH oder -SH), welches die Carbonylgruppe der zuvor gebildeten Peptidbindung attackiert. Durch Wasserabspaltung entsteht ein Oxazolin oder Thiazolin (Abbildung 1.1.5-1). Durch Oxidations- (Ox-) bzw. Reduktions- (Red-) Domänen können diese zunächst gebildeten einfach ungesättigten Heterocyclen dann in aromatische oder gesättigte Heterocyclen überführt werden (Du *et al.*, 2000). Die Cy-Domäne unterscheidet sich von den anderen traditionell als accessorische Domänen betrachteten Domänen dahingehend, dass sie eine Alternative zur C-Domänen zu treten (Finking und Marahiel, 2004).

7



Abbildung 1.1.5-1: Schematische Darstellung der Peptidkettenelongation durch Cyclokondensation. Gezeigt ist ein Ausschnitt einer hypothetischen Peptidsynthetase, bei der ein Modul anstelle einer Kondensationsdomäne über eine Cyclokondensationsdomäne (Cy) verfügt (vgl. Abb. 1.1.1 und 1.1.2-4).

Die hohe strukturelle Diversität nichtribosomal gebildeter Peptide resultiert aus dem Zusammenwirken der Domänen des kanonischen Domänensatzes, welche an sich schon in der Lage sind, ein breites Spektrum an Substraten zu aktivieren und in ein Produktmolekül einzubringen, mit modifizierend wirkenden Zusatz-Domänen. Als Beispiele hierfür sind in Abbildung 1.1.5-2 die NRPS-assembly lines von Bactitracin und Cyclosporin gezeigt. Die NRPS-assembly line des Bacitracins erzeugt durch Cylclokondensation, Epimerisierung und Lactamisierung eine von ribosomal synthetisierbaren Peptiden stark unterschiedliche Produktstruktur. Die Cyclosporin assembly line leistet dies durch die Aktivierung nicht-proteinogener Aminosäuren (D-Ala, Amino-Butansäure und Butenylmethylthreonin), N-Methylierung und Cyclisierung.



Abbildung 1.1.5-2: Generierung struktureller Diversität durch Peptidsynthetasen am Beispiel der NRPSassembly lines des Bacitracins und des Cyclosporins. (A) Bacitracin-Synthetasen aus Bacillus licheniformis. (B) Cyclosporin-Synthetase aus Tolypocladium inflatum. Über bzw. unter der schematischen Darstellung der Proteine der assembly lines sind die Strukturformeln der durch sie gebildeten Hauptprodukte angegeben. Die Pfeile bezeichnen jeweils die α -C-Atome der durch die Initiationsmodule der jeweiligen assembly lines eingebrachten Aminosäurebausteine.

1.1.6 Konservierte Motive von Peptidsynthetasen (Core-Motive)

NRPS-Module sind hochkonserviert. Dies drückt sich durch die Konservierung ihrer katalytischen Domänen aus, die jeweils charakteristische Signaturen (Core-Motive) aufweisen (Abb. 1.1.6-1).



Abbildung 1.1.6-1: Die Lage der hochkonservierten Sequenzmotive (Core-Motive) von NRPS-Modulen am Beispiel des D-Valin-Moduls der ACMSII und des N-Methyl-Valin-Moduls der ACMSIII. Die ACMSII und ACMSIII sind einmal in der in dieser Arbeit durchgängig gebrauchten formalen Darstellung gezeigt, darunter jeweils eines Teilbereich der Synthetasen als maßstabsgetreue Darstellung der Primärstruktur, unter Kennzeichnung der Lage der konservierten Motive (als senkrechte Linien markiert). Die Consensus-Sequenzen der konservierten Motive (nach Marahiel et al., 1997) sind für die jeweiligen Domänen angegeben.

1.2 Polyketidsynthasen des Typs I: NRPS-verwandte Systeme

Bei den Polyketiden handelt es sich um eine große, strukturell diverse Gruppe von Naturstoffen, die vor allem durch Actinomyceten gebildet werden (Katz und Donadio, 1993, Weissman und Staunton, 2001). Polyketide leiten sich von kurzkettigen Carbonsäuren (Acetat, Propionat und Butyrat) her, die zum Aufbau der höhermolekularen und strukturell diversen Polyketide durch sogenannte Polyketidsyntasen (PKS) verknüpft werden. Die katalytischen Funktionen der PKS sind prinzipiell die gleichen wie bei den Fettsäuresynthasen.

Die PKS werden nach Aufbau und Funktionsweise in Gruppen unterteilt: Bei den PKS des Typs I handelt es sich, wie bei den Peptidsynthetasen, um polyfunktionale Megasynthetasen (im Größenbereich von 200 bis 2000 kDa), die ebenfalls aus Modulen bestehen. Wie in den NRPS ist auch in den modularen PKS I jeweils ein Modul für genau einen Schritt der Kettenelongation (hier durch die Verknüpfung von Acylresten mit Malonat bzw. Methylmalonat) verantwortlich (Cane und Walsh, 1999). Ein gut untersuchtes Modellsystem für modulare PKS des Typs I sind die Erythromycinpolyketidsynthasen aus Saccharopolyspora erythrea (Donadio et al., 1991, Bevitt et al., 1992).

Bei den Polyketidsynthetasen des Typs II hingegen finden die individuellen Syntheseschritte an einem Set alleinstehender Domänen statt. Diese Untereinheiten werden zum Aufbau der Zielstruktur (aromatische Polyketide oder Fettsäuren) dann mehrfach benutzt (iterative PKS). Als Prototyp einer solchen iterativen PKS kann die Fettsäuresynthase aus *E. coli* betrachtet werden.



Abbildung 1.2-1: Beispielstrukturen für Naturstoffe, die unter Mitwirkung von PKS II (links) bzw. PKS I (rechts) gebildet werden.

11

Die Biosynthese der pilzlichen Metaboliten 6-Methylsalicylsäure und Lovastatin erfolgt an PKS mit PKS-I-Architektur, jedoch durch iterativen Einsatz eines Modules, dementsprechend werden diese Systeme als iterative PKS I bezeichnet (Staunton und Weissman, 2001).

PKS des Typs III sind homodimere, iterativ arbeitende β-Ketosynthasen. Als Prototyp der PKS Typ III ist die pflanzliche Chalkon-Synthase zu betrachten (Austin und Noel, 2003).

1.2.1 Aufbau der Polyketidsynthasen des Typ I

Wie bei den NRPS-Modulen kann man auch für PKS-Module einen minimalen Domänensatz identifizieren. Dieser besteht aus einer Acyltransferasedomäne (AT), einer ACP-Domäne (*acyl carrier protein*) und einer Ketosynthase-Domäne (KS). Die kanonische Sequenz ist KS-AT-ACP. Neben diesen kanonischen Domänen können in PKS-Modulen weitere, modifizierende Domänen vorkommen. Herausragende Bedeutung kommt dabei einem Satz von Reduktionsdomänen zu, die man sich in einer "reduktiven Schleife" angeordnet vorstellt (Staunton, 1998). Die vollständige reduktive Schleife umfaßt eine Ketoreduktasedomäne (KR), eine Dehydratisierungsdomäne (DH) und eine Enoyl-Reduktase-Domäne (ER).

1.2.2 Mechanismus der Polyketidsynthese

Die Acyltransferase (AT) katalysiert den Transfer eines Malonyl- oder Methylmalonyl-Restes von der entsprechenden CoA-Verbindung auf einen 4'-PPant-Arm, der seinerseits kovalent an die ACP-Domäne (acyl carrier protein) gebunden ist. Die Ketosynthase (KS) katalysiert zunächst den Transfer der zuvor an der ACP-Domäne des vorangehenden Moduls aufgelaufenen intermediären Polyketidkette auf einen zur KS-Domäne gehörigen Cystein-Rest, sodann die Kondensation (unter CO2-Abspaltung) dieser Polyketidkette mit der an der carboxyterminal befindlichen ACP-Domäne gebundenen Malonyl- oder Methylmalonylgruppe. Wie bei der Peptidsynthese an NRPS kommt es also zur Kettenverlängerung durch nucleophile Angriffe auf die als Thioester aktivierten Acyl-Intermediate; der Unterschied zur Chemie der Kettenelongation an NRPS liegt in der Natur des angreifenden Nucleophils, das bei der Polyketidsynthese durch Deprotonierung einer aciden CH₂-Gruppe gebildet wird (Claisen-Kondensation). Zudem requirierten die Polyketidsynthasen ihre Substrate bereits in der als CoenzymA-Thioester aktivierten Form, wohingegen die Polypeptid**synthetasen** die Aktivierung ihrer Substrate unter ATP-Verbrauch selbst leisten.

1.2.3 Die Initiation der Polyketidsynthese

Ebenso wie die Initiationsmodule der Peptidsynthetasen benötigen die Initiationsmodule der PKS nicht den vollen kanonischen Domänensatz von Elongationsmodulen. Der minimale Domänensatz für ein PKS-Initiationsmodul besteht nur aus einer AT- und einer ACP-Domäne. Derartige Initiationsmodule findet man z.B. in den PKS-assembly lines des Avermectins und des Erythromycins. Sie verwenden wahrscheinlich Monocarboxyl-CoA-Substrate wie Propionyl-CoA oder Isobutyl-CoA und stellen die Carbonsäurekomponente zur Kettenelongation durch das nächste Modul in Form des an die ACP-Domäne gebundenen Thioesters zur Verfügung.

Man findet aber auch Initiationsmodule mit KS-Domänen, wobei diese KS-Domänen gegenüber KS-Domänen aus Elongationsmodulen häufig eine Mutationen im katalytischen Zentrum aufweisen ("KS^Q", Bisang *et al.*, 1999). Es wird vermutet, dass Elongationsmodule, die über eine KS^Q-Domäne verfügen, anstelle von Monocarboxyl-CoA-Verbindungen Dicarboxyl-CoA-Substrate verwenden, wobei diese vor der Elongation durch das nachfolgende Modul durch die katalytische Aktivität der KS^Q-Domäne decarboxyliert werden.

Für mehrere PKS-Systeme ist eine Co-Ligase als "*loading domain*" beschrieben worden, so etwa für die Biosynthese des Rapamycins (Schwecke *et al.*, 1995) oder des Candicidins (Campelo und Gil, 2002). Enzymologische Untersuchungen zur Initiation der Rifamycin-Biosynthese werfen jedoch die Frage auf, ob es sich nicht zumindest bei einem Teil der als CoA-Ligase-Domänen beschriebenen Untereinheiten tatsächlich um NRPS-Initiationsmodule handeln könnte (Admiraal *et al.*, 2001).

1.2.4 Die Termination der Polyketidsynthese

Wie bei der Fettsäure-Biosynthese und bei der Mehrzahl der bekannten bakteriellen NRPS-Systeme dienen auch in PKS-I-Systemen Thioesterasedomänen zur Freisetzung des fertigen Syntheseprodukts.

1.2.5 Wirkungsmechanismus von Extradomänen

Das Produkt, das bei den PKS durch den minimalen Ketten-Elongationscyclus gebildet wird, ist ein β -keto-Ester. Durch die in der "reduktiven Schleife"

angeordneten Domänen kann die β -Carbonylgruppe dieses β -keto-Esters bis auf die Stufe einer CH₂-Gruppe reduziert werden. Wie in Abb. 1.2.5-1 dargestellt, umfaßt der vollständige Domänensatz der reduktiven Schleife jeweils eine DH-, ER- und KR-Domänen, wobei aber auch Module mit unvollständigem Domänensatz angetroffen werden.



Abbildung 1.2.5-1: Allgemeiner Aufbau einer PKS I (A) und Wirkungsweise der "reduktiven Schleife" aus KR-, DH- und ER-Domäne (B). Initiations- und Terminationsmodule einer PKS I können ebenso wie Elongationsmodule über zusätzliche Domänen verfügen, die jedoch hier der Übersichtlichkeit halber nicht dargestellt sind.

In Abwesenheit der ER-Domäne führt der Reduktionsprozeß nicht bis zur Methylen-Stufe, es verbleibt eine Doppelbindung im Produkt. Liegt nur die KR-Domäne vor, so wird im Produkt eine Hydroxygruppe vorgefunden. Durch die Kombination von Modulen mit unterschiedlich besetzten reduktiven Schleifen erreichen PKS I eine hohe strukturelle Produktvielfalt (vergleiche die in Abbildung 1.2.5-2 wiedergegebene Domänenanordung der an der Synthese des 6-Deoxyerythronolid B beteiligten PKS-Modulen).



Abbildung 1.2.5-2: Die drei Megasynthetasen des Erythromycin-PKS-Systems (DEBS). Über den ACP-Domänen sind die jeweiligen Polyketid-Intermediate dargestellt (Abbildung modifiziert nach Staunton und Weissman, 2001).

1.2.6 Hybride NRPS-PKS-Systeme

Polyketidsynthasen und nichtribosomale Peptidsynthetasen teilen nicht nur den modularen Aufbau und einen vergleichbaren Elongationsmechanismus, sondern sind auch zum direkten Zusammenwirken bei der Bildung eines Oligokondensates befähigt. Dies kann durch das Zusammenwirken von auf getrennten Proteinen lokalisierten PKS- und NRPS-Modulen geschehen, wie zum Beispiel bei der Rapamycin-Biosynthese in Streptomyces hygroscopicus (Schwecke et al., 1995, König et al., 1997) oder der Epothilon-Biosynthese in Sorangium cellulosum (Chen et al., 2001, Tang et al., 2001). Ebenso gibt es aber auch Biosynthesesysteme, in denen NRPS- und PKS-Module auf einem gemeinsamen Protein beheimatet sind, ein solches NRPS-PKS-Hybridenzym ist z.B. an der Myxothazol-Biosynthese in Stigmatella aurantiaca beteiligt (Silakowski et al., 1999). Einen Sonderfall stellt das hybride PKS/NRPS-Enzym MycA aus dem Mycosubtilin Gencluster von Bacillus subtilis dar, bei dem sich auf der Schnittstelle zwischen PKS- und NRPS-Modulen eine bislang einzigartige Pyridoxal-5'-Phosphat-abhängige Amin-Transferasedomäne befindet (Aron et al., 2005). Häufiger findet man NRPS-/PKS-Mischsysteme, bei denen ein NRPS-Initiationsmodul eine Aryl-Carbonsäure zur Kettenverlängerung durch anschließende PKS-Module bereitstellt, so z. B. bei der Microcystin-Biosynthese in Microcystis aeruginosa (Tillett et al., 2000) oder bei der Rifamycin-Biosynthese in Amycolatopsis mediteranei (Admiraal et al., 2001).

1.3 Die Biosynthese der Actinomycine

Die Actinomycine, eine Familie bicyclischer Chromopeptidlaktone, werden von einer Vielzahl verschiedener Streptomyces-Stämme (u.a. Streptomyces antibioticus, Streptomyces parvulus und Streptomyces chrysomallus) gebildet. Allen Actinomycinen ist das Actinocin (2-Amino-4,6-Dimethylphenoxazin-3-on-1,9dicarbonsäure) als chromophore Gruppe gemeinsam. Mit dieser Dicarbonsäure sind zwei Pentapeptidlacton-Ringe amidartig verknüpft. Die Biosynthese dieser Peptide erfolgt nichtribosomal, wobei die ungewöhnliche Aryl-Carbonsäure 4-Methyl-3hydroxy-anthranilsäure (4-MHA) als Substrat für das Initiationsmodul und somit auch als formaler Aminoterminus der gebildeten Peptidkette fungiert (Abb. 1.3-1).



Abbildung 1.3-1: Biosynthese des 4-MHA-Pentapeptids durch die Actinomycinsynthetasen (ACMSI, ACMSII und ACMSIII) sowie das AcmACP. Über den T-Domänen sind die jeweiligen Peptidyl-Intermediate dargestellt.

Nach erfolgter Peptidkettensynthese und Laktonisierung dimerisieren zwei Actinomycinhalbmoleküle zu Actinomycin, wobei die beiden 4-MHA-Einheiten das Actinocin-Chromophor bilden (Abb. 1.3-2).



Abbildung 1.3-2: Bildung von Actinomycin durch oxidative Dimerisierung zweier "Actinomycinhalbmoleküle" (4-MHA-Pentapeptidlaktone)

Die Biosynthese des Actinomycin-Halbmoleküls beginnt mit der Aktivierung der 4-MHA (4-Methyl-3-Hydroxy-Anthranilsäure) als Adenylat durch ACMS I, einer alleinstehenden A-Domäne (Stindl und Keller, 1993). Ein eigenständiges Acyl-Carrier-Protein (AcmACP) fungiert als T-Domäne und bindet die 4-MHA als Thioester (Pfennig *et al.*, 1999). Das nächste an der Reaktionsfolge beteiligte Enzym ist ACMS II, eine 280 kDa große bimodulare Peptidsynthetase, die Threonin und Valin aktiviert und im Valin-Modul eine E-Domäne besitzt. Das von ACMS II synthetisierte Aroyldipeptid 4-MHA-Thr-Val wird nach der Epimerisierung des Valinanteils zur D-Form auf das von ACMS III gebundene Prolin übertragen. Von der ACMS III wird das Tripeptid dann mit Sarkosin und N-Methyl-Valin verlängert. Letztere beide Aminosäuren werden zuvor als Glycin und Valin aktiviert und dann methyliert, um darauf folgend an die wachsende Peptidkette kondensiert zu werden.

Tabelle 1.3-1: Übersicht über die Actinomycinsynthetasen. Angegeben sind der Name des Proteins sowie des jeweils kodierenden Gens, der pl, die molekulare Masse (der Apo-Proteine) sowie die Funktionalitäten (Domänenanordungen) auf den jeweiligen Proteinen. Für A-Domänen ist in Klammern jeweils das wichtigste Substrat angegeben.

Protein	Gen	Mw	PI	Domänenanordnung
ACMS I	acmA	51,34 kDa	6,20	A (4-MHA*)
AcmACP	acmD	8,69 kDa	4,17	т
ACMS II	астВ	283,97 kDa	5,51	CA(Thr)TCA(Val)TE
ACMS III	acmC	462,30 kDa	5,21	CA(Pro)TCA(Gly)MTCA(Val)MTTe

* Die ACMS I akzeptiert anstelle des natürlichen Substrates 4-MHA auch eine Reihe strukturverwandter Carbonsäuren (Keller und Schlumbohm, 1992). Der Name 4-Methyl-3-Hydroxy-Anthranilsäure ist traditionell und entspricht nicht exakt der IUPAC-Nomenklatur.

Die Actinomycin-Biosynthesegene liegen in *Streptomyces chrysomallus* als Gencluster vor (Schauwecker *et al.*, 1998, Schauwecker *et al.*, 2001). Im Zentrum des Genclusters liegen die Peptidsynthetasegene, die zu beiden Seiten von Genen mit putativer Funktion bei der Biosynthese der 4-MHA und bei der Ausbildung der Actinomycinresistenz umgeben sind (Abb. 1.3-3).



Abbildung 1.3-3: Die Anordnung der Peptidsynthetasegene im Actinomycinbiosynthesegencluster von Streptomyces chrysomallus. Die Gene werden durch Pfeile repräsentiert, die entsprechend ihrer (z.T. putativen) Funktion gefärbt sind. Die Peptidsynthetasegene (blaue Pfeile) sind in der unteren Zeile der Abbildung in einem anderen Maßstab als die restlichen Gene des Clusters dargestellt. Das Cluster wird zu beiden Seiten von IS-Elementen begrenzt ("IS").

1.4 Rekombinante NRPS-Systeme

der Peptidsynthetasen, d.h. die Anordnung Die modulare Struktur ihrer konstituierenden Domänen, ist hoch konserviert. Es ist möglich, dass sich NRPS-Module durch die Fusionierung ursprünglich selbständiger Domänen entwickelt haben und dass Genduplikationen zu multimodularen Systemen und Genclustern geführt haben. Bei der Entstehung von NRPS-Systemen könnte auch horizontaler Gentransfer eine Rolle gespielt haben. Der offensichtliche Bezug von Modulanordnung und Zahl der Module in einem NRPS-System zur Sequenz und Größe des Peptidproduktes läßt erwarten, dass aus der Neukombination von Modulen oder von in ihnen enthaltenen Domänen Enzyme resultieren, die veränderte oder neue Produkte bilden können. Arbeiten der Arbeitsgruppen Leadley und Khosla haben gezeigt, dass im Falle der PKS ganze Module oder Domänen in Modulen durch gleichartige Einheiten ersetzt werden können (Cortes et al., 1995; Piper et al., 1995). Dies äußerte sich z.B. in der Synthese verkürzter Polyketide (Abb. 1.4-1) oder durch den Einbau anderer Bausteine an bestimmten Positionen des Polyketides, welches durch die resultierende rekombinante PKS produziert wird.



Abbildung 1.4-1: Produktion eines verkürzten 6-Desoxyerythronolid-Derivates durch die rekombinante Peptidsynthetase DEBS1-Te. Oben: Wildtyp PKS-assembly line des 6-Deoxyerythronoid B. Unten: Die rekombinante PKS DEBS1-Te und ihr Produkt, (2R,3S,4S,5R)-2,4-Dimethyl-3,5-dihydroxy-n-heptansäure- δ -lakton.

Im Gegensatz zu den PKS-Systemen waren Arbeiten an modularen NRPS weniger weit fortgeschritten. Untersuchungen durch die Arbeitsgruppe Marahiel hatten ergeben, dass der Austausch von A-Domänen in Modulen zu veränderten Produkten führte. Dabei wurden die A- und T-Domäne eines NRPS-Moduls als funktionale Einheit ("Minimalmodul" oder "Aktivierungsdomäne") betrachtet und zusammen ausgetauscht. Auf diese Weise wurden Derivate des Surfactin-Biosynthesesystems von Bacillus subtilis erzeugt (Stachelhaus et al., 1995, Schneider et al., 1998). Verschiedene Aktivierungsdomänen der Surfactinsynthetasen konnten durch Aktivierungsdomänen aus anderen NRPS-Systemen ersetzt werden (vgl. Abb. 1.4-2). Durch einige der entsprechend gentechnisch modifizierten Bacillus subtilis-Stämme wurden Surfactin-Derivate gebildet, die an der vorhergesagten Position einen Aminosäureaustausch aufwiesen. Allerdings zeigten die rekombinanten Systeme eine stark verminderte Produktivität. Versuche an künstlich mit fremden Substraten beladenen Modulen der Gramicidin-Synthetasen (Belshaw et al., 1999) ergaben, dass Kondensationsdomänen eine geringe Selektivität gegenüber der an der vorhergehenden T-Domäne gebundenen Peptidkette aufweisen, jedoch gegenüber dem am eigenen Modul gebundenen Aminosäuresubstrat sehr viel selektiver sind.

Diese Selektivität der Kondensationsdomänen verlangt nach Fusionsstrategien, bei denen die Kondensationsdomänen nur zusammen mit ihren zugehörigen Adenylierungsdomänen versetzt werden. Dies lässt sich sowohl durch die Fusionierung von kompletten Modulen am T-C-Übergang (Mootz *et al.*, 2000) oder durch Fusionierungen am A-T-Übergang (Doeckel und Marahiel, 2000) erzielen.



Abbildung 1.4-2: Rekombinantes NRPS-System nach Schneider et al. (1998). Die A- und T-Domäne ("Minimalmodul") im Leu-Modul von SrfA-A (gelb) wurde durch Minimalmodule aus verschiedenen Peptidsynthetasen ersetzt, was hier am Beispiel des Orn-Moduls aus GrsB (rot) dargestellt ist. Nach gene replacement in B. subtilis wurde gefunden, dass der resultierende Stamm das erwartete Surfactin-Derivat (Leu² -> Orn) produzierte. Die Domänen des Hybrid-Enzyms sind entsprechend ihrer Herleitung von SrfA-A oder GrsB farbig hinterlegt.

Die Versetzbarkeit von Thioesterasedomänen wurde durch Experimente am Surfactin-Cluster von Bacillus subtilis durch Fusionierung der Thioesterasedomäne der SrfAC hinter verschiedene Module der Surfactin-Synthetasen (de Ferra *et al.*, 1997) sowie durch die Fusionierung von verschiedenen Te-Domänen hinter das zweite Modul von der Tyrocidin-Synthetase TycB (Schwarzer *et al.*, 2001) demonstriert (Abb. 1.4-3).

Der Erfolg all dieser Strategien liegt wahrscheinlich an der Wahl des Fusionspunktes. In bacillären Systemen haben Fusionen in den Übergangsbereichen von A- zu T-, C- zu T- und T- zu C-Domäne zu funktionsfähigen rekombinanten Peptidsynthetasen geführt. Offensichtlich ist in diesen Systemen – zumindest in den zur Fusionierung gewählten Bereichen – eine Toleranz gegenüber den aus einer Fusionierung erwachsenden Änderungen der Proteinstruktur gegeben.



A) Surfactin-assembly line / Bacillus subtilis





Abbildung 1.4-3: Rekombinante Surfactin-NRPS-assembly line zur Produktion eines verkürzten Surfactin-Derivates (de Ferra et al., 1997). Dargestellt ist die Wildtyp assembly line des Surfactins (A) und das rekombinante System (B), das durch Fusionierung der Te-Domäne von SrfA-C (rot unterlegt) hinter das Val-Modul von SrfA-B erhalten wurde.

Eine alternative Strategie zur Erzeugung von rekombinanten Peptidsynthetasen durch den Austausch von kompletten Modulen wurde von Yakimov *et al.* (2000) beschrieben, die Hybridenzyme aus Synthetasen der eng verwandten Surfactin- und Lichenysin-NRPS-assembly line durch Fusionierung in den hochkonservierten Sequenzmotiven der C-Domänen erzeugten (Abb. 1.4-4).



C) Hybrides System nach Yakimov et al. (2000)



Abbildung 1.4-4: Rekombinante Surfactin-NRPS-assembly line zur Produktion eines Surfactin-Derivates (Glu¹ -> Gln) nach Yakimov et al. (2000). Dargestellt sind (A) die assembly line des Surfactins (gelb), (B) die assembly line des Lichenysins (blau) und das hybride System (C), das durch den Austausch des durch Klammern gekennzeichneten Bereiches von SrfA-A durch den analog gekennzeichneten Bereich von LchA-A erhalten wurde.

Ein gänzlich anderer Ansatz zur Erzeugung von Peptidsynthetasen mit veränderter Produktspezifität durch gene engineering beruht darauf, durch gezielte Punktmutationen die Substratspezifität der Adenylierungsdomänen zu verändern (Stachelhaus et al., 1999; Eppelmann et al., 2002).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Die Untersuchungen der Arbeitsgruppe Keller an der Actinomycin-Biosynthese hatten zur Identifizierung des Actinomycin-Biosynthesegenclusters von *Streptomyces chrysomallus* geführt. Im Zentrum des Actinomycin-Biosynthesegenclusters wurden vier NRPS-Gene gefunden, die für drei Peptidsynthetasen kanonischer Struktur sowie für eine separate A-Domäne und für eine separate T-Domäne kodieren. Durch heterologe Expression in *Streptomyces lividans* konnten die im Actinomycin-Biosynthesegencluster kodierten Peptidsynthetasen in aktiver Form erhalten werden, die Identität dieser Enzyme mit den bereits zuvor enzymologisch charakterisierten Actinomycinsynthetasen aus *S. chrysomallus* konnte nachgewiesen werden.

Durch Rekombination der Actinomycinsynthetasegene *acmB* und *acmC* und heterologe Expression der erhaltenen rekombinanten NRPS-Gene in *S. lividans* waren erste funktionell aktive hybride Actinomycinsynthetasen erhalten worden, in denen die A- und T-Domäne des D-Valin-Moduls der ACMSII durch die A-, M- und T-Domäne des N-Methyl-Valin-Moduls der ACMSIII ersetzt worden waren. Diese Konstrukte besaßen allerdings weder ein Initiationsmodul noch eine Te-Domäne. Der Nachweis der Fähigkeit dieser Ezyme zur Produktildung war durch *in vitro* Testung möglich. Bei Substratzugabe liefen die Produkte in kovalent gebundener Form an der Synthetase auf und konnten nach Abspaltung vom Enzym isoliert und identifiziert werden.

Um die Synthese unter *turnover* untersuchen zu können, sollten nun als primäres Ziel dieser Arbeit neue rekombinante Peptidsynthetasen mit Aktivitäten zur Initiation der Peptidsynthese und zur Freisetzung des Produktes hergestellt werden. Rekombinante Peptidsynthetasen, in denen jeweils alle Aktivitäten der Initiation, Elongation und Freisetzung auf einer Polypeptidkette liegen, sollten durch geeignete Verknüpfung von für die erforderlichen Domänen und Module kodierenden Genfragmenten, vorzugsweise aus dem Actinomycinsynthetase-System, und nachfolgende heterologe Expression der resultierenden rekombinanten NRPS-Gene gewonnen werden. Die Charakterisierung der nach heterologer Expression erhaltenen rekombinanten Peptidsynthetasen sollte Aufschluss geben über

 die Kompatibilität der eingesetzten Domänen und Module, die als Ergebnis der Fusionierung in einem nicht-natürlichen Kontext zueinander stehen
- die Eignung der gewählten Fusionspunkte zu Generierung funktionell aktiver rekombinanter Peptidsynthetasen

wodurch wiederum Rückschlüsse auf Struktur-Funktionsbeziehungen in den Actinomycinsynthetasen möglich sein sollten.

Die künftige Anwendung rekombinanter NRPS-Systeme ist vor allem in der biokombinatorischen Erzeugung von neuen Naturstoff-Leitstrukturen zu vermuten. Vor diesem Hintergrund ist es von großem Interesse, Fusionierungsstrategien, die sich zur rekombinanten NRPS-Genen durch Neukombination Erzeugung von von Genfragmenten einzigen aus einem oder mehreren eng verwandten Biosynthesystemen bewährt haben, auch auf Genfragmente sehr heterologer Herkunft oder Funktion anzuwenden. Dazu sollte hier ein PKS-Modul aus einem geeigneten NRPS-PKS-Hybridsystem in eine rekombinante Synthetase eingebracht und auf Kompatibilität mit den NRPS-Modulen untersucht werden.

Die Erzeugung funktional aktiver rekombinanter Peptidsynthetasen setzt nicht nur geeignete Strategien zur Generierung ihrer kodierenden Gene voraus, sondern auch eine Möglichkeit, diese in geeigneter Weise zu exprimieren. Da in der Regel sehr große Gene zu exprimieren sind, deren Genprodukte zur Gewinnung ihrer vollständigen katalytischen Aktivität noch posttranslationell modifiziert werden müssen, ist dies nicht als triviale Problemstellung anzusehen.

In den Vorarbeiten war in der Arbeitsgruppe Keller die heterologe Expression von Actinomycinsynthetasegenen und davon abgeleiteter rekombinanter NRPS-Gene in *S. lividans* etabliert worden. Da einerseits der in diesem Expressionssystem eingesetzte Promotor (mel-P) als Hauptursache für nicht immer gleichbleibend gute Enzymausbeuten angesehen wurde, andererseits aber aus den Untersuchungen an *S. chrysomallus* bekannt ist, dass dieser Stamm ein sehr verlässlicher Actinomycinproduzent ist, was auch als Indiz für eine sehr stabile Expression der Actinomycinsynthetasegene gewertet werden kann, sollten als weiteres Ziel dieser Arbeit die Promotoren der Actinomycinsynthetasegene charakterisiert und auf ihre Eignung zur heterologen Expression von NRPS-Genen in *Streptomyces* untersucht werden.

2. Materialien

2.1 Mikroorganismen

Streptomyces lividans TK64	John Innes Collection
Streptomyces chryosmallus SCI	ATCC11523
E. coli DH5α	Hanahan, 1983
E. coli JM109	Yanisch-Perroln et al., 1985
E. coli M15	Qiagen, Hilden
Bacillus subtilis OKB105	Nakano et al., 1988
Bacillus brevis	ATCC 8185

2.2 Vektoren und Plasmide

pTZ18U	Mead et al., 1988	
pSP72	Promega, Mannheim	
pSL1180	Pharmacia, Freiburg	
pBluescript IISK(+)	Stratagene, Heidelberg	
pQE30	Qiagen, Hilden	
pIJ702	Katz et al., 1983	
pSPIJ004	Laborsammlung AK Keller	

2.3 Oligonucleotide und Nucleinsäuren

2.3.1 PCR-Primer

Alle zur PCR-Amplifikation von Genfragmenten eingesetzten Primer wurden von TIB-MOLBIOL (Berlin) bezogen.

flo-041099-A flo-041099-B flo-041099-C flo-041099-D flo-041099-E flo-041099-F flo-160100-A flo-160100-B flo181099-A flo181099-B man020802A man020802B man230402A man230402C	5'-GCA ACG AAG ATC IGG CGG CCG IGG GCG AA-3' 5'-CAG CTG AAG CTI GTA TGC CAG CAG CCG GG-3' 5'-GGC CTG GCC GAA TIC GCC GAG GAG CTG A-3' 5'-GGG CAG GAT CCC TIC TAG ACC CGA CGA CGT CAT TT-3' 5'-CAA CCC GAG GAT CCG CTC AGC CGT ATC GAT-3' 5'-TCC TCG GCG AAT TCG GCC AGG CGG GCC GCC GT-3' 5'-TCA AAT ICT IGA AAA ACG GGG GCT CTG ATG GC-3' 5'-TCG CCG AAT TCC IGG ACC TCG ACG ACC CGG ACG GCT-3' 5'-TCG CCG AAT TCC IGG ACC TCG ACG ACC CGG ACG GCT-3' 5'-CCG GAC CTC TAG AGC GCC GGC CCG CTG GGC CGG CTC GAC GAA-3' 5'-CCG GAC CTC TAG AGC GCC GGC CCG CTG GGC CGG CTC GAC GAA-3' 5'-CAC ATC GCG GGC GAC GGC TGG TCC CT-3' 5'-CGTG GGC GAC GAC CAG CAG GAC GTG TT-3' 5'-TIGA AAG CTT AGC GTT ICG TCG CCG ACC CCT-3' 5'-CCT CTA GAC TGC AGG GCG AAG TCC GGT TCG GGC AGG GCC GCT-3'
flo-160100-A	5'-CAG AAT TCT TGA AAA ACG GGG GCT CTG ATG GC-3'
flo-160100-B	5'-IGA III CIA GAG IIG GCI CAI IGG CIG ICI CC-3'
flo181099-A	5'-TCG CCG AAT TCC TGG ACC TCG ACG ACC CGG ACG GCT-3'
flo181099-B	5'-CCG GAC CTC TAG AGC GCC GGC CCG CTG GGC CGG CTC GAC GAA-3'
man020802A	5'-CAC ATC GCG GGC GAC GGC TGG TCC CT-3'
man020802B	5'-GTG GGC GAC GAC CAG CAG GAC GTG TT-3'
man230402A	5'-TGA AAG CTT AGC GTT TCG TCG CCG ACC CCT-3'
man230402B	5'-CCT CTA GAC TGC AGG GCG AAG TCC GGT TCG GGC AGG GCC GCT-3'
man230402C	5'-TTC GCC CTG CAG GGG ACC GGC CGG GA-3'
man230402D	5'-TCG TCT AGA CTA GGA GAG CGG CAT CA-3'
man230502A	5'-TCG CCG GGA CCG GTC GGG AGC CGC GCA-3'
man230502B	5'-AAG CGG GTC TAG AGG GCG AGG GCG GTG ATG TT-3'
man250402B	5'-TCC CGA CCG GTC CCG GCG AGG GCG A-3'
man250402C	5'-TCG CCG GGA CCG GTC GGG AGG CCC GCA-3'
man270602A	5'-TCA CCC TGC AGG GGA CCG GCC GGG AGC CGC GCA-3'

man271101C	5'-TIG TIG CAT GCA CCA TIT ATC GGC CAT-3'
man271101D	5'-TAT TCT CCT TCG ACC ATA CGT GGT GGT GGT GGT GGT GGT GCC GTA CGG GTT T-3'
man290200A	5'-CAG GAA TIC GGC GAT CCC GCC CGG CGT CGG-3'
man290200B	5'-GCC GAA TTC ATA GGA CAG CAG CTC GAC-3'
man290200C	5'-CGT CTA GAT CGG TCG TGG TCA TGA GTT CGC-3'
man290200D	5'-GTG GCC GAA TTC ATC ACG CAT-3'
man290200E	5'-TAT CTA GAT GCC GTC TTA TTT CAG-3'
man290402A	5'-CAA AGA GCT CCC TGC TTA CAT GAT TCC G-3'
man290402B	5'-CGG CTC CTC TAG AAG GAT GTT AGG GAT GG-3'
man291101A	5'-TTI GGG CAT GCC GTG GTG GTG GTG GTG GTG GTG CAT ACC AGC TTC CTC TTA T-3'
FACEX2	5'-GAG GGC ATG CAT ATG GCC GAT AAA TGG TGG GGG GAA-3'
RFUS1	5'-GCC CTG ATG TCG TCC TTC GGA TCC CCG AGG CCC-3'
FFUS2	5'-CCT CGA GATC TCG AAG GAC GAC ATC AGG GCG AT-3'
RFUS2	5'-CGG CGG CAT GCG CTC CGC GGG CAG CGC CGT-3'

2.3.2 Primer für primer-extension-Experimente

Für primer-extension-Experimente wurden 5-[32 P] markierte DNA-Primer (2000

Ci/mmol) eingesetzt (Hartmann Analytics, Braunschweig).

AcmAlO311001	5'-CGG GTG ACC GGG GCG GCC GA-3'
AcmAlO151101	5'-CCG CAG TCC GGC GAC TCC GG-3'
AcmBIO311001	5'-AGT CGT TGC TCG GCG ATC CA-3'-3'
AcmBIO151101	5'-GGA TCT CGA GGT ATT CGC CG-3'

2.3.3 Nucleinsäuren

Lambda-DNA

Sigma, Taufkirchen

2.4 Nährmedien

Alle Medien und Medienbestandteile wurden direkt nach dem Ansetzen autoklaviert (alle Medien mit Ausnahme von YEME 20 min bei 121°C, YEME 20 min bei 110°C). Zur Herstellung von Agarplatten wurden dem Medium vor dem Autoklavieren 1,5% Agar (w/v) (Agar No.3, Oxoid, Wesel) zugesetzt, das Medium wurde dann entweder vor dem Erstarren in Petrischalen vergossen (ca. 25 ml Medium pro Petrischale) oder nach dem Abkühlen und Lagerung bei RT zum Vergießen in einem Mikrowellenofen aufgekocht.

Wenn zur Selektion Antibiotika zugesetzt wurden, dann erfolgte die Zugabe der entsprechenden Antibiotika-Stammlösungen zu Flüssigmedien erst nach dem Abkühlen auf RT, bei Festmedien erst kurz vor dem Erstarren des abkühlenden Mediums.

<u>dYT-Medium</u>

Vollmedium zur Kultivierung von E. coli (Sambrook et al., 1989)

16 g Bacto Trypton, 10 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, aqua (bidest.) ad 1 l.

Zur Selektion auf plasmidtragende E. coli-Zellen wurden dem Medium 100 µg/ml Ampicillin zugesetzt.

YEME-Medium

Flüssigmedium zur Kultivierung von Streptomyces lividans (Hopwood et al., 1985)

3 g Hefeextrakt, 3 g Malzextrakt, 5 g Bacto-Pepton, 10 g Glucose oder Maltose, 340 g Sucrose, aqua (bidest.) ad 1 l. Vor Gebrauch wurde 2,5 M MgCl₂-Lösung bis einer Finalkonzentration von 5 mM zugegeben.

Zur Selektion auf plasmidtragende Streptomyces-Stämme wurden dem Medium 5 µg/ml Thioestrepton zugesetzt.

HMM-Medium

Vollmedium für Streptomyces (Keller et al., 1985)

5 g Hefeextrakt, 5 g Malzextrakt, 5 g Maltose, aqua (bidest.) ad 1 l.

Zur Selektion auf plasmidtragende *Streptomyces-Stämme* wurden dem Flüssigmedium 5 µg/ml Thiostrepton zugesetzt, für HMM-Festmedium betrug die Thiostrepton-Konzentration 25 µg/ml.

HMG-Medium

Vollmedium für Streptomyces (DSM-Katalog, 1993 [Medium 65])

5 g Hefeextrakt, 5 g Malzextrakt, 5 g Glucose, aqua (bidest.) ad 1 l.

Zur Selektion auf plasmidtragende *Streptomyces*-Stämme wurden dem Flüssigmedium 5 µg/ml Thioestrepton zugesetzt, für HMG-Festmedium betrug die Thiostrepton-Konzentration 25 µg/ml.

<u>R5-Medium</u>

Festes Medium zur Regeneration von Streptomyces-Protoplasten (Hopwood *et al.*, 1985)

103 g Sucrose, 10 g Glucose, 0,25 g K₂SO₄, 10,1 g MgCl₂x6H₂O, aqua (bidest.) ad 800 ml. R5-Medium wurde in Portionen von je 160 ml nach Zusatz von 1,5% (w/v) Agar autoklaviert. Dem fast bis zur Starre abgekühlten Medium wurden zugegeben: 1 ml Natronlauge [1 M], 2 ml KH₂PO₄-Lsg. [0,5% (w/v)], 3 ml L-Prolin-Lsg. [20% (w/v)], 10 ml Hefeextrakt-Lsg. [10% (w/v)], 16 ml CaCl₂-Lsg. [3,68% (w/v)], 20 ml TES-Puffer (pH=7,2) [5,73% (w/v)].

Zur Selektion auf plasmidtragene Strepomyces-Stämme wurden dem Medium 25 μ g/ml Thiostrepton zugesetzt.

2.5 Puffer und Lösungen

2.5.1 Puffer für die Proteinpräparation

Puffer A (pH 8,0)

10% (w/v) Glycerol, 200 mM TrisHCl, 1 mM EDTA, 20 mM DTE, 5 mM Benzamidin, 5 mM PMSF

<u>Puffer B (pH 8,0)</u>

15% (w/v) Glycerol, 100 mM TrisHCl, 1 mM EDTA, 4 mM DTE, 1mM Benzamidin, 1 mM PMSF

Puffer C (pH 6,8) (DEAE-Puffer)

15% (w/v) Glycerol, 100 mM KPO₄-Puffer (pH 6,8), 1 mM EDTA, 2 mM DTE, 1 mM Benzamidin, 1 mM PMSF

Ni-NTA Laufpuffer (pH 8,0)

15% (w/v) Glycerol, 50 mM KPO₄-Puffer (pH 8,0), 300 mM NaCl, 4 mM DTE, 1 mM Benzamidin, 1 mM PMSF

Ni-NTA Waschpuffer (pH 6,0)

15 % (w/v) Glycerin, 50 mM KPO₄-Puffer (pH 6.0), 300 mM NaCl, 4 mM DTE, 1 mM Benzamidin, 1 mM PMSF

2.5.2 Weitere Puffer und Lösungen

ATP-Reaktionsmix	5 mM ATP, 10 mM MgCl2, 0,5 mM PPi, ca. 0,5
10 10-	μ CI/ml [³² P]PP _i 200 ma M Tria 200 ma M D and in man 40 ma M EDTA
IOX IBE	900 mm Iris, 900 mm Borsdure; 40 mm EDTA
Ampicillin-Stammlösung	100 mg/ml Ampicillin in Wasser (bidest)
ATP-Stopmix	0,05 mol Tetrasodiumdiphosphat, 27 ml 70%
	Perchlorsäure, 50 ml 14% Norit A-Lösung
Bradford-Reagenz	100 mg Coomassie Brilliant Blue G250, 100 ml 85%
	(v/v) Phosphorsäure, 50 ml Ethanol
	auf 1000 ml mit dest. Wasser
DNA-Probenpuffer	0,25% (w/v) Bromphenolblau, 0,25% (w/v)
-	Xylencyanol-FF, 50% (w/v) Sucrose
Entfärber für Proteingele	10% (v/v) Essigsäure und 20% (v/v) Methanol
NoritA-Lösung	Norit A 70 g auf 500 ml Wasser
NTA-Probenpuffer (pH 8)	49 ml 1 M \widetilde{KH}_2PO_4 , 150 g Glycerol, 300 mM NaCl ad
	1
NTA-Waschpuffer (pH 6)	16 ml K ₂ HPO ₄ , 34 ml KH ₂ PO ₄ , 150 g Glycerol, 300

	mM NaCl ad 11
PAGE-Probenpuffer	33,3% b-Mercaptoethanol (v/v), 3 % SDS (v/v), 13,3
	% Sucrose (w/v), 0,083% Bromphenolblau (w/v)
PEG1000-Lösung	1 g PEG1000 (autoklaviert, 20 min, 120°C); vor
	Gebrauch erfolgte Zugabe von 3 ml P-Puffer (pH
	8)
P-Puffer	103 g Sucrose, 025 g K ₂ SO ₄ , 2,02 g MgCl ₂ (x 6 H ₂ O),
	aq. ad 800 ml; wurde in Portionen von je 80 ml
	autoklaviert, vor Gebrauch wurden zugegeben:
	1ml 0,5%ige KH2PO4-Lösung, 10 ml 3,68%ige CaCl2-
	Löung, 10 ml 5.73%iger TES-Puffer (pH 7.2)
RNase-Stammlösuna (10x)	10 mg/ml Ribonuklease (aus Rinderpankreas) in TE-
	Puffer
TBE-Sequenzierungspuffer	135 mM Tris: 131 mM Borsäure: 2.5 mM EDTA
TBS	25 mM Tris-HCl, pH 7.5: 137 mM NaCl
TBS-Tween	TBS mit 0.1 % (w/v) Tween
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl pH 8.0
Thiostrepton-Stammlösuna	50 ma/ml Thiostrepton in DSMO
10 x TBE	900 mM Tris: 900 mM Borsäure: 40 mM FDTA
20 x SSC	3 M NaCl: 300 mM Tringtriumcitrat
Phosphatase-Substratpuffer	100 mM Tris-HCL pH 9.5: 100 mM NaCL: 5 mM MaCL
Stop-Mix	23.3 a Na-Pyrophosphat: 27 ml 70%-ige
	Perchlorsäure: 50 ml 7 5%-ige Norit-A-Lsg : auf 500
	ml dest. Wasser

2.6 Radiochemikalien

¹⁴ C-Threonin, 250 mCi/mmol	Amersham, Freiburg
¹⁴ C-Valin, 260 mCi/mmol	Amersham, Freiburg
[³² P]-Natriumpyrophosphat, 17,8 Ci/mmol	Amersham, Freiburg

2.7 Feinchemikalien

3-Hydroxyanthranilsäure 4-Ethylbenzoesäure 4-Methyl-Hydroxyanthranilsäure 4-Methyl-3-Hydroxybenzoesäure Acrylamid Agarose (peqGOLD Universal Agarose) Ammoniumsulfat (für biol. Zwecke) ATP Bacto-Typton Bacto-Pepton Benzamidin Borsäure BSA DTE EDTA Hefeextrakt Malzextrakt

Merck, Darmstadt Aldrich, Steinheim Keller et al., 1984 EGA-Aldrich, Steinheim Gerbu, Gaiberg peqLab, Erlangen Merck, Darmstadt Sigma, Taufkirchen Difco, Detroit Difco, Detroit Sigma, Taufkirchen Merck, Darmstadt Sigma, Taufkirchen Biomol, Hamburg Fluka, Buchs Difco, Augsburg Serva, Heidelberg

N',N'-Methylen-bis-Acrylamid Norit A PEG 1000 PMSF p-Toluylsäure TRIS

2.8 Enzyme und Kits

Lysozym DNasel Ribonuclease A Restriktionsendonucleasen

T4-DNA-Ligase VENT-DNA-Polymerase JETsorb – DNA extraction kit Thermo Sequenase cycle sequencing kit

2.9 Säulenmaterialien

DEAE-Zellulose Ultrogel AcA34 Q-Sepharose FF (fast flow) Ni-NTA-Agarose

2.10 Geräte und sonstige Materialien

French Press Zelle Schüttelinkubator New Brunswick G25 ELISA-Reader Scintillationszähler "Wallac 1409" TCL linear analyzer "Tracemaster 20" Kühlzentrifuge RC2-B SS-34-Rotor Kühlzentrifuge Minifuge II Tischzentrifuge Eppendorf 5436 Membranfilter ME-25 DC-Alufolien 20x20 cm, Kieselgel F₂₅₄ Szintillationsflüssigkeit "Quicksafe A" Thermomixer Eppendorf 5436 Microelisa Auto Reader Fluka, Neu-Ulm Sigma, Deisenhofen Merck, Darmstadt Sigma, Taufkirchen EGA-Aldrich, Steinheim Biomol, Hamburg

Sigma, Deisenhofen Sigma, Taufkirchen Sigma, Taufkirchen GIBCO BRL, Eggenstein Invitrogen, Karlsruhe New England Biolabs, Ipswich Strategene, Heidelberg GIBCO BRL, Eggenstein New England Biolabs, Ipswich GENOMED, Bad Oeynhausen USB-Amersham, Bad Homburg

Whatman, Maidstone BioSepta, Idenstein Amersham Biosciences, Freiburg Qiagen, Hildesheim

AMINCO, Silver Spring New Brunswick, New Brunswick Dynatek, Denkendorf Wallac, Freiburg Berthold, Wildbach Sorvall, Bad Homburg Du Pont, Bad Homburg Heraeus Christ, Hanau Eppendorff, Hamburg Schleicher und Schüll, Dassel Merk, Darmstadt Zinsser Analytik, Frankfurt Eppendorf, Hamburg Dynatech, Denkendorf

2.11 Software

Multiple Alignments von Aminosäuresequenzen wurden mit **ClustalX** (Thomson *et al.*, 1997) berechnet. Anzeige und gegebenenfalls manuelle Nachbearbeitung der so erhaltenen Alignments erfolgte mit **GeneDoc** (Nicholas und Nicholas, 1997).

Die Vorhersage des isoelektrischen Punktes sowie der Molekularmasse von Proteinen erfolgte mit den **Protein Identification and Analysis Tools** im **ExPASy Server** (Wilkins *et al.*, 1999).

Sequenzierungs-Chromatogramme wurden mit **Chromas Lite 2.01** (Technelysium Pty Ltd., www.technelysium.com.au) ausgewertet.

2.12 Datenbank-Referenzen

Die zur Generierung der multiplen Alignments genutzten Proteinsequenzen stammen aus öffentlichen Datenbanken (EMBL, Refseq, SwissProt). In Tabelle 2.11-1 sind für die in den multiplen Alignments auszugsweise wiedergegebenen Proteinsequenzen Proteinname, Organismus und Datanbank-Referenz angegeben.

Tabelle 2.12-1: Auflistung der in den multiplen Alignments wiedergegebenen Proteinsequenzen. Den in den Alignments verwendeten Kurzbezeichnungen sind hier die Proteinnamen aus den Datenbankeinträgen (SwissProt/EMBL), die Organismen und die jeweilige accession-Nummer zugeordnet.

Abkürzung	Protein	Organismus	DB-Referenz
AcmACP	4-methyl-3-hydroxyanthranilic acid acyl carrier protein	Streptomyces chryosmallus	AF134588
ACMSI	actinomycin synthetase I	Streptomyces chryosmallus	AF134587
ACMSII	actinomycin synthetase II	Streptomyces chrysomallus	AF047717
ACMSIII	actinomycin synthetase III	Streptomyces chrysomallus	AF204401
BacA	bacitracin synthetase 1	Bacillus licheniformus	AF007865
BacB	bacitracin synthetase 2	Bacillus licheniformus	AF007865
BacC	bacitracin synthetase 3	Bacillus licheniformus	AF007865
CDA_PS1	CDA peptide synthetase I	Streptomyces coelicolor	CAB38518
CDA_PS2	CDA peptide synthetase II	Streptomyces coelicolor	CAB38517
CDA_PS3	CDA peptide synthetase III	Streptomyces coelicolor	CAD55498
Grs2	gramicidin S synthetase 2	Bacillus brevis	BAA06146
LicB	lichenysin synthetase B	Bacillus licheniformis	AAD04758
MtaD	myxothiazol PKS/NRPS	Stigmatella aurantiaca	AAF19812
МусА	microcystin peptide synthetase	Anabaene sp. 90	AJ536156
МусВ	microcystin peptide synthetase	Anabaene sp. 90	AJ536156
MycC	microcystin peptide synthetase	Anabaene sp. 90	AJ536156
SrfAA	surfactin synthetase srfA1	Bacillus subtilis	140485
SrfAB	surfactin synthetase srfA2	Bacillus subtilis	140486
SrfAC	surfactin synthetase srfA3	Bacillus subtilis	Q08787
ТусА	tyrocidine synthetase 1	Bacillus brevis	P09095
ТусВ	tyrocidine synthetase 2	Bacillus brevis	T31075
ТусС	tyrocidine synthetase 3	Bacillus brevis	T31076

3. Methoden

3.1 Methoden im Umgang mit Nucleeinsäuren

Standardtechniken zur Manipulation von DNA und zur Transformation von Mikroorganismen wurden, falls nicht ausdrücklich anders angegeben, nach Sambrook et al. (1989) bzw. nach Hopwood et al. (2000) durchgeführt.

3.1.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die molekülgrößenabhängige Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte durch Horizontal-Agarose-Gelelektrophorese, die Agarosekonzentration der eingesetzten Gele lag, je nach angestrebtem Trennungsbereich, zwischen 0,8% und 1,5%. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung im Bereich von 50 bis 120 V. Um die UV-Detektion der DNA-Fragmente zu ermöglichen, wurde dem Agrosegel 1 µl/ml Ethidiumbromid zugesetzt. Als Größenstandard fand *Pst*I-geschnittene Lambda-DNA Verwendung, 1x TBE diente als Elektrophoresepuffer.

Zur hochauflösenden Auftrennung der Produkte von Sequenzierungs- und primer extension-Reaktionen wurden Polyacrylamid-Gele (6% (w/v) Acrylamid; 0,33% (w/v) Bisacrylamid; 8 M Harnstoff, 0,1% (w/v) APS, 0,072% (w/v) TEMED, in TBE-Sequenzierungspuffer) eingesetzt. Die Detektion der Signale erfolgte hier durch Autoradiographie.

3.1.2 Eluierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte entweder mit dem Jetsorb-Kit (Genomed), sigma-spin-Filtrationseinheiten (sigma) oder, vorzugsweise bei sehr großen DNA-Fragmenten, nach dem "Phenol-Freeze"-Protokoll (Sambrook *et al.*, 1989).

3.1.3 Polymerase-Chain-Reaction (PCR)

Die PCR wurde im Rahmen dieser Arbeit zur Amplifizierung von Genfragmenten eingesetzt, wobei durch geeignete Primerwahl PCR-Mutagenese betrieben wurde (zum Einführen bzw. Aufheben von Erkennungssequenzen von Restriktionsendonucleasen sowie Einbringen von künstlichen Stopcodons). Die PCR-Reaktionen wurden unter Verwendung der VENT-Polymerase (New England Biolabs, Ipswich) bzw. des "Herculase"-Polymerase-Gemisches (Stratagene, Heidelberg) durchgeführt. Als Template wurden 10-200 ng DNA pro Reaktionsansatz eingesetzt. Die Inkubation erfolgte in dem jeweiligen vom Hersteller gelieferten Reaktionspuffer, der außerdem die Primer (1 μ M je Primer), 250 μ M dNTPs (je Nucleotid), 2 units Polymerase sowie 5% (v/v) DMSO enthielt.

Die PCR-Reaktionen wurden bei Verwendung der VENT-Poylmerase in einem Gesamtvolumen von 100 µl und bei Verwendung des Herculase-Polymerase-Mixes in einem Gesamtvolumen von 50 µl durchgeführt. Die Primer-Template-Kombinationen und Temperaturprogramme der einzelnen PCR-Reaktionen sind in Tabelle 3.1.3 aufgeführt; dort nicht extra angegeben ist ein Denaturierungsschritt (5 min bei 95°C) der zu Beginn sämtlicher PCR-Programme durchgeführt wurde. Bei Verwendung der Vent-Polymerase wurde diese erst nach dem Denaturierungsschritt zugegeben. Bei Verwendung des Herculase-Polymerase-Gemisches wurde dieses hingegen schon vor dem Denaturierungsschritt zugesetzt, da dieser gleichzeitig der Aktivierung der in Form eines inaktiven Antikörper-Konjugates zugesetzten Polymerasen diente.

 Tabelle 3.1.3: PCR-Reaktionen und Temperaturprogramme. Um die Reaktionen den in Abschnitt 3.2

 angegebenen Klonierungswegen eindeutig zuzuordnen, sind in der ersten Spalte der Tabelle die

 Konstrukte angegeben, in denen die Amplifikate zunächst zwischenkloniert wurden (Spalte "Konstrukt").

Konstrukt	Primer 1	Primer 2	Template	Polymerase	Denat.	Annealing	Elongation
PV3-131099	flo-041099-E	flo-041099-F	pA1sub67	VENT	95°C / 60s	65°C / 60s	72°C / 80s
PE2-1301099	flo-041099-C	flo-041099-D	pA1sub61	VENT	95°C / 60s	68°C / 60s	72°C / 120s
PHB2-191099	flo-041099-A	flo-04-1099-B	pSPIJ004	VENT	95°C / 60s	65°C / 60s	72°C / 80s
PT6-101199	flo181099-A	flo181099-B	, pP1sub20	VENT	95°C / 60s	65°C / 60s	72°C / 80s
PSU1-230100	flo-160100-A	flo-160100-B	, Chromosom. DNA	VENT	95°C / 60s	60°C / 60s	72°C / 80s
PTyc1-160300	man290200D	man290200E	Chromosom. DNA	VENT	95°C / 60s	55°C / 60s	72°C / 60s
PMeNeu5-070400	flo-041099-E	man290200A	pACM49	VENT	95°C / 60s	60°C / 60s	72°C / 180s
PAPage	man230402A	man250402B	pACM47	Herculase	95°C / 60s	55°C / 60s	72°C / 60s
PTPage	man250402C	man230402D	pA1sub67	Herculase	95°C / 60s	55°C / 60s	72°C / 60s
PAP-LQ	man230402A	man230402B	pACM45	Herculase	95°C / 60s	55°C / 60s	72°C / 60s
PTP-LQ	man230402C	man230402D	pACM47	Herculase	95°C / 60s	55°C / 60s	72°C / 60s
PTplusA	man230502A	man230502B	pP1sub3	Herculase	95°C / 60s	60°C / 60s	72°C / 150s
PAlrik	man130802A	man130802B	pE-25	Herculase	95°C / 60s	60°C / 30s	72°C / 60s
PHelme	man140802A	man140802B	pE-25	Herculase	95°C / 60s	60°C / 30s	72°C / 60s

3.1.4 Präparation von Plasmid-DNA aus Streptomyceten

Zur Präparation von Plasmid-DNA aus *Streptomyces* wurden aus einer drei Tage alten Flüssigkultur etwa 50 mg Mycel durch Zentrifugation geerntet. Die Präparation erfolgte entsprechend einer Vorschrift von Kieser (2000) durch Lysozymbehandlung, alkalische Lyse, Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanol-Präzipitation.

3.1.5 Präparation von Plasmid-DNA aus E. coli

Zur Präparation von Plasmid-DNA wurde E. coli in dYT-Medium (unter Zugabe der jeweiligen Selektionsmarker) kultiviert. Nach 14 bis 18 h Wachstum wurden die Zellen durch Zentifugation geerntet und nach Lysozym-Behandlung alkalisch lysiert, es wurden Zellen aus 2 ml Kultur eingesetzt. Die Nucleinsäuren wurden durch Phenol-Chloroform-Extraktion gereinigt und durch Ethanol-Präzipitation isoliert. Dieses Verfahren folgt einem Protokoll von Sambrook (1989), das auf einer Vorschrift von Birnboim und Doly (1979) basiert.

3.1.6 Präparation von chromosomaler bakterieller DNA

Zur Präparation chrosomaler DNA aus Bacillus brevis (ATCC 8185) und Bacillus subtilis (OKB 105) wurden Zellen aus einer Flüssigkultur, welche die stationäre Phase erreicht hatte, eingesetzt. Jeweils 5 g Zellen wurden in flüssigem Stickstoff gemörsert, während des Mörserns erfolgte die portionsweise Zugabe von 5 ml Lysepuffer. Das feingemörserte Homogenat wurde mit Phenol-Chloroform (5:1) extrahiert. Aus der wäßrigen Phase wurde die chromosomale DNA (nach mehrfacher Extraktion mit Phenol-Chloroform) durch Ethanol-Präzipitation isoliert. Die gefällte DNA wurde mit Ethanol (70%) gewaschen, getrocknet und in TE-Puffer resuspendiert. Die resuspendierte DNA wurde einem RNase-Verdau, einer weiteren Phenol-Chloroform-Extraktion und anschließender Ethanol-Fällung unterzogen. Nach Resuspendieren in TE-Puffer wurde die so präparierte chromosomale DNA als *template* für PCR-Amplifikationen eingesetzt, eine Qualitätskontrolle erfolgte durch Gelelektrophorese eines Aliquots der präparierten chromosomalen DNA an einem 0,8%-igen Agarosegel.

3.1.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Die zu ligierenden DNA-Fragmente stammten aus Plasmiden oder PCR-Produkten und verfügten nach Inkubation mit geeigneten Restriktionsenzymen über definierte Enden. Die durch den Restriktions-Verdau erhaltenen Fragmente wurden durch Elektrophorese aufgetrennt, die gewünschten Fragmente wurden aus dem Gel eluiert, in TE-Puffer aufgenommen und zur Ligation eingesetzt. Dabei wurde mit einem etwa zwei- bis dreifachen Überschuß an Insert gegenüber dem Vektorfragment gearbeitet. Ein typischer Ligationsansatz hatte ein Gesamtvolumen von 35 µl und enthielt 0,5 U T4-Ligase. Ligiert wurde entweder 16 h bei 12°C oder 2 h bei 37°C, danach wurden die Ligationsansätze direkt zur Transformation in *E. coli* eingesetzt.

3.1.8 DNA-Sequenzierungen

Um Mutationen durch Artefakte der PCR auszuschließen, wurden Amplifikate vor dem Einbringen in Expressionskonstrukte routinemäßig in geeignete Vektoren (pSP72, PTZ18, pSL1180, pBlueskript) subkloniert und sequenziert. Dies geschah entweder unter Anwendung des "Thermo Sequenase cycle sequenzing kit" der Firma USB-Amersham (Bad Homburg) oder des *big-dye-terminator kit* (Applied Biosystems, Foster City, USA). Die in den Sequenzierungsreaktionen eingesetzte Plasmid-DNA war nach dem unter 3.1.5 angegebenen Protokoll isoliert worden, die Sequenzierungs-*kits* wurden nach Herstellerangaben eingesetzt.

Die unter Einsatz des big-Dye-Terminatoren Kit erhaltenen Reaktionsprodukte wurden beim Kooperationspartner (Actinodrug Pharmaceuticals GmbH) auf einem aufgetrennt detektiert. Die Kapillarsequenzer und dabei erhaltenen Chromatogramme wurden unter Verwendung der Chromas-Software ausgewertet. Die zusammen mit dem "Thermo Sequenase cycle sequencing kit" verwendeten Primer wurden mit $[\alpha^{-35}S]$ -dATP markiert, die Auftrennung der in der Sequenzierungsreaktion erhaltenen Produkte erfolgte auf einem denaturierenden Polyacrylamid-Gel, zur Detektion der Signale wurde ein Autoradiogramm des getrockneten Sequenzgels angefertigt.

Die bei der gelelektrophoretischen Auftrennung der *primer-extension*-Reaktionsprodukte co-elektrophoresierten Sequenzleitern wurden unter Einsatz des "Thermo Sequenase cycle Sequenzing kit" und unter Einsatz der auch in den *primerextension*-Experimenten eingesetzten ³²P-markierten Primer erstellt.

3.1.9 Präparation bakterieller Gesamt-RNA

Die Präparation von Gesamt-RNA aus Mycel von Streptomyces spp. erfolgte unter ausschließlichem Einsatz von zweifach autoklavierten Geräten. Glasgeräte und Spatel wurden zusätzlich unmittelbar vor Verwendung abgeflammt, um eine Kontamination der Proben mit RNasen zu vermeiden. Wässrige Lösungen wurden, sofern sie nicht speziellen *kits* zur Präparation oder Analyse bakterieller RNA-Proben entnommen wurden, mit DEPC (f.c. 0,1% v/v) versetzt und anschließend zweifach autoklaviert (jeweils 20 min bei 121°C).

Die zur Gesamt-RNA-Präparation eingesetzten Streptomyces-Stämme wurden submers kultiviert und zu definierten Zeitpunkten durch Zentrifugation geerntet (4000 rpm; Heraeus, Minifuge II) und mit 1X PBS-Puffer gewaschen. Die Zellen wurden unter flüssigem Stickstoff durch Mörsern aufgeschlossen und in sterile und RNase-freie Microreaktionsgefäße (Eppendorf) überführt. Die weitere Isolierung von Gesamt RNA erfolgte unter Einsatz des SV Total RNA Isolation System-Kits (Promega, Mannheim) nach Angaben des Herstellers.

34

3.1.10 Primer-Extension Experimente

Primer-Extension-Experimente wurden durchgeführt, um die Transkriptionsstartpunkte der Actinomycinsynthetasegene zu bestimmen. Die Analyse der Transkriptionsstartpunkte beruht auf der reversen Transkription der mRNA in ³²Pmarkierte DNA-Fragmente, die sich von definierten Primer-Bindungsstellen im Polypeptid-kodierenden Bereich bis zum 5'-Ende der mRNA erstrecken.

Dazu wurden etwa 20 µg frisch präparierte gesamt-RNA in einem Gesamtvolumen von 30 µl in Anwesenheit von 0,6 pmol [³²P]-ATP-markiertem Primer, 5 u AMV reverser Transkriptase, 40 u RNasin (RNase-Inhibitor, Promega, Mannheim), 6 mM dNTP (1,5 mM each) und 33,3 mg/l Actinomycin D in dem vom Herstellter gelieferten Puffer inkubiert (42°C, 1 h). Gesamt-RNA und Primer wurden vor Zugabe der weiteren Komponenten 5 min bei 95 °C denaturiert, auf Eis abgekühlt und auf 42°C vortemperiert. Zur Analyse der Reaktionsprodukte wurden diese mit den wie in Abschnitt 3.1.8 beschrieben erzeugten Sequenzierungsreaktionen in einem Polyacrylamid-Gel co-chromatographiert, zur Detektion der Signale wurde ein Autoradiogramm des getrockneten Gels angefertigt.

3.2 Klonierung der eingesetzten Plasmide

Alle Klonierungsschritte fanden unter Anwendung der unter 3.1 beschriebenen Methoden in *E. coli* statt. Die in den Klonierungswegen verwendeten PCR-Produkte wurden wie unter Punkt 3.1.3 beschrieben erzeugt.

3.2.1 Vektorsysteme für die Expression von NRPS-Genkonstrukten in Streptomyces

Für die Expression der in der Folge beschriebenen NRPS-Genkonstrukte wurden das Plasmid pSPIJ004 sowie das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Nachfolge-Konstrukt pSPIJ005 verwendet (Restriktionskarten beider Plasmide in Abb. 4.1-1). pSPIJ004 ist ein *shuttle*-Plasmid, das durch die Kombination des *E. coli* Plasmids pSP72 (Promega, Mannheim) und des *Streptomyces*-Plasmides pIJ702 (John Innes Collection, Norwich) erzeugt wurde und in beiden Organismen als autonomes Plasmid in hoher Kopienzahl repliziert wird. Als Promotor für die Expression der NRPS-Genkonstrukte wurde zunächst der mel-Promotor und später der im Rahmen dieser Arbeit charakterisierte acm-Promotor verwendet. Zur Expression unter Kontrolle des mel-Promotors wurde das zu exprimierende Genkonstrukt in eine das Startcodon des *melC1-*Gens überlappende *SphI-*Schnittstelle eingebracht. Schauwecker *et al.* (1998) haben auf diese Weise das *acmB-*Gen heterolog in *S. lividans* exprimiert.

Um aus pSPIJ004 pSPIJ005 zu erhalten, wurden die *SphI*-Schnittstelle an bp 5123, die *PstI*-Schnittstelle an bp 5117 und die *Bam*HI-Schnittstelle an bp 4357 durch PCR-Mutagenese entfernt. Dazu wurde ein Teilstück des Plasmidrumpfes (von bp 4357 bis 5125) durch PCR mit den Primern flo-041099-A und flo-041099-B amplifiziert, als *Hind*III-*BgIII*-Fragment in pSP72 subkloniert (Δ*Hind*III/*BgIII*) und sodann als *Hind*II-*BgIII*-Fragment in *Hind*III-*Bam*HI-gespaltenes pSPIJ004 eingebracht.



Abbildung 3.2.1-1: Restriktionskarten der Plasmide plJ702 und pSP72 sowie der von ihnen abgeleiteten shuttle-Plasmide pSPIJ004 und pSPIJ005. Um die Herleitung der shuttle-Plasmide von pSP72 und plJ702 zu verdeutlichen, wird plJ702-Sequenz rot dargestellt, pSP72-Sequenz blau. Die Resistenzgene sowie das mel-Operon aus PlJ702 sind eingezeichnet (bla: β-Lactamasegen, tsr: Thiostreptonresistenzgen, melP, melC1 und melC2: mel-Promotor und Gene des mel-Operons). Zu beachten ist, dass in pSPIJ004 und pSPIJ005 der mel-Promotor nicht mehr vorhanden ist. Die in dieser Arbeit beschriebenen Expressionskonstrukte entstanden formal dadurch, dass ein zu exprimierendes Gen zusammen mit einem geeigneten Promotor (mel- oder acm-Promotor) in die mit bp 1 bezeichnete singuläre Bg/II-Schnittstelle von pSPIJ004 oder pSPIJ005 eingebracht wurde.

3.2.2 Klonierung von pACM46

Der für die Valin-Aktivierungsdomäne (A- und T-Domäne) kodierende Bereich des acmB-Gens wurde durch PCR von bp 4495 bis bp 6299 mit den Primern flo-041099-E und flo-041099-F unter Einführung einer BamHI-Schnittstelle an bp 4503 und einer EcoRI-Schnittstelle an bp 6286 amplifiziert und als BamHI-/EcoRI-Fragment in pTZ18 subkloniert (pV3-131099). Der für die Epimerasedomäne kodierende Bereich des acmB-Gens wurde durch PCR von bp 6276 bis 29 bp hinter dem Stopkodon mit den Primern flo-041099-C und flo-041099-D unter Einführung einer EcoRI-Schnittstelle an bp 6286, einer Xbal-Schnittstelle (11 bp hinter dem Stopkodon des acmB-Gens) und einer BamHI-Schnittstelle 19 bp hinter dem Stopkodon amplifiziert und als EcoRI-/BamHI-Fragment in pTZ18 subkloniert (pE2-1301099). Das EcoRI-/BamHI-Fragment aus pE2-131099 wurde in pBluescriptIISK(+) umkloniert, man erhielt pE1-191099. Das Clal-/EcoRI-Fragment aus pV3-131099 wurde in pE1-191099 kloniert, man erhielt pVE1-241099. Um den 5'-seitigen Teil des acmB-Gens (bis zur Clal-Schnittstelle an bp 4519) einzubringen, wurde ein bereits bestehendes Konstrukt (pACM32, Laborsammlung AG Keller) herangezogen, welches das gesamte acmB-Gen als SphI-/BamHI-Fragment hinter einem Pstl-/Sphl-klonierten mel-Promotor enthielt, der Vektorrumpf stammte von pSP72 ab. Durch Clal-/BamHI-Verdau wurde der 3'-seitige Teil des acmB-Gens entfernt und anschließend durch das Clal-/BamHI-Fragment aus pVE1-241099 ersetzt, es resultierte VE32-2-281099. Nach Hindll-/BamHI-Verdau von VE32-2-281099 konnte der zur Transformation in S. lividans benötigte Streptomyces-Anteil des shuttle-Plasmides pSPIJ005 als Bglll-/Hindlll-Fragment eingebracht werden, man pSPIJ005) erhielt (unter Komplettierung des Vektorrumpfes das von Expressionsplasmid pACM46.

3.2.3 Klonierung von pACM47

Der für die Thioesterasedomäne kodierende Bereich des *acm*C-Gens wurde durch PCR von bp 11902 bis 334 bp nach dem Stopkodon mit den Primern flo181099-A und flo181099-B unter Einführung einer EcoRI-Schnittstelle an bp 11908 und einer Xbal-Schnittstelle 221 bp hinter dem Stopkodon amplifiziert und als EcoRI-/Xbal-Fragment in pTZ18 subkloniert (pT6-101199). Durch EcoRI-/Xbal-Verdau konnte der für die Epimerasedomäne kodierende Genbereich aus pACM46 entfernt werden, durch Klonierung des EcoRI-/Xbal-Fragmentes aus pT6-101199 in den Restvektor erhielt man pACM47.

3.2.4 Klonierung von pACM48

Der für die Thioesterasedomäne kodierende Bereich des *srfA*-C-Gens wurde durch PCR von bp 3105 bis 49 bp nach dem Stopkodon mit den Primern flo-160100-A und flo-160100-B unter Einführung einer EcoRI-Schnittstelle an bp 3107 und einer Xbal-Schnittstelle 38 bp hinter dem Stopkodon amplifiziert und als EcoRI-/Xbal-Fragment in pTZ18 subkloniert (pSU1-230100). Durch EcoRI-/Xbal-Verdau konnte der für die Epimerasedomäne kodierende Genbereich aus pACM46 entfernt werden, durch Klonierung des EcoRI-/Xbal-Fragmentes aus pSU1-230100 in den Restvektor erhielt man pACM48.

3.2.5 Klonierung von pACM54

Der für die Thioesterasedomäne kodierende Bereich des *tycC*-Gens wurde durch PCR von bp 18685 bis bp 16 bp nach dem Stopkodon mit den Primern man290200D und man290200E unter Einführung einer *EcoRI*-Schnittstelle an bp 18691 und einer *XbaI*-Schnittstelle 8 bp nach dem Stopkodon amplifiziert und als *EcoRI*-/*XbaI*-Fragment in pTZ18 kloniert (pTyc1-160300). Durch *EcoRI*-/*XbaI*-Verdau konnte der für die Epimerasedomäne kodierende Genbereich aus pACM46 entfernt werden, durch Klonierung des *EcoRI*-/*XbaI*-Fragmentes aus pTyc1-160300 in den Restvektor erhielt man pACM54.

3.2.6 Klonierung von pACM50

Die Genfusion zwischen dem 5'-seitigen Teil des acmB-Gens (bis zu der Clal-Schnittstelle an bp 4519) und dem für die N-Methyl-Valin-Aktivierungsdomäne (A-, Mund T-Domäne) kodierenden Genbereich aus dem acmC-Gen (ab einer künstlichen Clal-Schnittstelle an bp 8911 des acmC-Gens) war schon in einem Konstrukt aus der Laborsammlung der Arbeitsgruppe Keller realisiert worden (pACM40). Allerdings verfügt pACM40 nicht über das für die Te-Domäne kodierende 3'-Ende von acmC. Der für die Te-Domäne kodierende Bereich des acmC-Gens war im Rahmen dieser Arbeit schon zur Erzeugung von pACM47 amplifiziert und als EcoRI-/Xbal-Fragment in pTZ18 subkloniert worden (pT6-101199). Allerdings sollte zur Klonierung von pACM50 anders als pACM47 und Nachfolgekonstrukten – keine künstliche EcoRI-Fusionschnittstelle in das zu erzeugende rekombinante Gen eingebracht werden. Daher wurde unter Ausnutzung interner Schnittstellen der (veränderte) 5'-Bereich des Te-kodierenden Fragmentes durch eine gegenüber dem acmC-Gen unveränderte Sequenz ersetzt. Dazu wurde zunächst der 3'-seitige Teil des Thioesterasekodierenden Genabschnitts durch Spaltung von pT6-101199 mit Bg/II und HindIII gewonnen. Die dabei gespaltene Bg/II-Schnittstelle befindet sich im Insert (entsprechend bp 12488 in acmC), während sich die HindIII-Schnittstelle im Polylinker downstream des Te-kodierenden Inserts befindet. Das erhaltene BgllI-HindlII-Fragment wurde in das Bglll-/Hindlll-gespaltene Konstrukt pP1sub5 (Laborsammlung AK Keller) eingebracht, man erhielt p1-260100. pP1sub5 enthält als Insert eine Teilsequenz des acmC-Genes, deren 3'-Bereich durch das Einbringen des Bglll-Hindlll-Fragmentes aus pT6-101199 vervollständigt wurde. Aus p1-260100 konnte daher ein Teil des für die N-Methyl-Valin-Valin-Aktivierungsdomäne kodierenden Genbereiches von acmC samt dem nachfolgenden, für die Thioesterasedomäne kodierenden Genbereiches als Notl-/HindIII-Fragment gewonnen werden (die interne Notl-Schnittstelle im Insert von p1-260100 entspricht bp 11467 in acmC-Gen). Durch Fusion an dieser internen Notl-Schnittstelle konnte das aus p1-260100 gewonnene Fragment in das Konstrukt pACM40 (Laborsammlung AK Keller) eingebracht werden, dabei wurde der für die N-Methyl-Valin-Aktivierungsdomäne kodierende Genabschnitt von acmC wieder komplettiert. Das Einbringen des plJ702-Anteils in das zunächst erhaltene E. coli-Plasmid erfolgte, wie es schon für die Klonierung von pACM46 beschrieben wurde, man erhielt pACM50.

3.2.7 Klonierung von pACM55

Der für die N-Methyl-Valin-Aktivierungsdomäne kodierende Bereich des *acm*C-Gens (bp 8850 bis bp 11908) wurde durch PCR amplifiziert, als Template diente das Konstrukt pACM49 (Laborsammlung AG Keller). Die Amplifikation erfolgte mit den Primern flo-041099-E und man290200A unter Einführung einer *ClaI*-Schnittstelle (entsprechend bp 8911 in *acmC*) und einer *EcoRI*-Schnittstelle (entsprechend bp 8911 is *acmC*). Das Amplifikat wurde als *BamHI*-/*EcoRI*-Fragment in pTZ18 subkloniert, es resultierte pMeNeu5-070400. Durch *PstI*-/NotI-Verdau wurde der 5'-seitige Teil des Genfragments entfernt (*PstI*-Schnittstelle im Polylinker des pTZ18-Rumpfes, natürliche NotI-Schnittstelle im Genfragement) und anschließend durch das *PstI*-/NotI-Fragment aus pACM50 (meI-Promotor und 5'-Seite des für ACM50 kodierenden Bereiches bis zur natürlichen NotI-Schnittstelle) ersetzt, man erhielt pMeIn7-100400. Aus dem Plasmid konnte der gesamte kodierende Bereich zuzüglich des 5'-gelegenen meI-Promotors als *PstI*-/*EcoRI*-Fragment ausgeschnitten werden, durch Klonieren in *PstI*-/*EcoRI*-gespaltenes pACM47 erhielt pACM55.

39

3.2.8 Klonierung von pACM56

Aus dem Plasmid pMeln7-100400 wurde der gesamte kodierende Bereich zuzüglich des 5'-gelegenen mel-Promotors als *Pstl-/EcoRI*-Fragment ausgeschnitten und in pACM45 (Δ*Pstl-/EcoRI*) eingebracht, man erhielt pACM56.

3.2.9 Klonierung von p FUS*I_ACP32 und pACMA1FUS002

Durch PCR mit den Primern FACEX2 und RFUS1 an einem Subklon von DNA aus dem Actionomycin-Biosynthesegencluster von *Streptomyces chrysomallus* wurde das *acmA*-Gen unter Einführung einer *SphI*-Schnittstelle auf dem Startcodon der Translation und einer *BamHI*-Schnittstelle vor dem Stopcodon der Translation amplifiziert. Das Amplifikat wurde als *SphI-BamHI*-Fragment in pSP72 subkloniert, man erhielt pFUS*I.

Durch PCR mit den Primern FFUS2 und RFUS2 an einem Subklon von DNA aus Actinomycin-Biosynthesegencluster von *Streptomyces chrysomallus* wurde das *acmD*-Gen unter Einführung einer *Bglll-Schnittstelle* auf dem Startcodon der Translation und einer *Sphl-Schnittstelle* anstelle des Stopcodons der Translation amplifiziert. Das Amplifikat wurde als *Bglll-Sphl-Fragment* in pSP72 subkloniert, man erhielt pFUS*ACP1.

Durch BamHI-Bg/III-Fusion der Inserts aus pFUS*I und PFUS*ACP1 und SphI-SphI-Klonierung des resultierenden Fusionsgens in pSP72 erhielt man pFUS*I_ACP. Das SphI-SphI-Insert aus pFUS*ACP1 wurde in die SphI-Schnittstelle von pQE32 (Qiagen) kloniert, man erhielt das E. coli-Expressionskonstrukt pFUS*I_ACP32.

Das entsprechende Expressionskonstrukt für *Streptomyces* (pACMA1FUS002) entstand durch Umklonieren des Inserts aus pFUS*I_ACP32 (mitsamt der Hexa-Histidinkodierenden Sequenz) in das *shuttle-*Plasmid pSPIJ004 (F. Pfennig, pers. Mitteilung).

3.2.10 Klonierung von pACM45

Um ein Fusionsgen aus *acmA+acmD+acmB* zu erzeugen, wurde auf das Konstrukt pACM23 zurückgegriffen. Bei pACM23 handelt es sich um ein Konstrukt der Laborsammlung AK Keller, in dem das *acmB*-Gen im pSPIJ004-Rumpf vorliegt, wobei eine interne *SphI*-Schnittstelle durch *silent-M*utagenese beseitigt wurde und eine künstliche *SphI*-Schnittstelle auf das Startcodon der Translation gelegt wurde. Das Fusionsgen aus *acmA+acmD* wurde durch Spaltung mit *SphI* aus pFUS*I_ACP32 gewonnen und in die singuläre *SphI*-Schnittstelle von pACM23 kloniert, man erhielt pACM45.

3.2.11 Klonierung von pACM53

Durch Spaltung von pACM45 mit Sphl wurde der aus acmA und acmD abgeleitete Teil des rekombinanten Fusionsgens acm45 gewonnen. pACM50 wurde durch partielle Spaltung mit Sphl linearisiert, durch Einbringen des Sphl-Sphl-Fragmentes aus pACM45 erhielt man pACM53.

3.2.12 Klonierung von pIOACM53

intercistronische Der Bereich zwischen den NRPS-Genen des Actinomycinbiosynthesegenclusters aus S. chrysomallus wurde (zusammen mit den ersten 265 bp von acmA) dem genomischen Subklon pPA1sub27 (Pfennig et al., 1998) als 0,9 kb Sall/EcoRI-Fragment entnommen und in pSP72 (ASall/EcoRI) kloniert, man erhielt pACMprom72. Unter Ausnutzung einer im pSP72-Polylinker 5'-seitig des (Promotorbereich) Pstl-Schnittstelle Inserts gelegenen konnte der nun Promotorbereich mit den anschließenden ersten 265 nt des acmA-Gens als PstI/EcoRI-Fragment aus pACMprom72 gewonnen und in pACM53 (ΔPstI/EcoRI) kloniert werden, man erhielt pIOACM53. Da acm53 mit einer dem acmA-Gen homologen Sequenz beginnt, wurde das Gen durch das Einbringen der ersten 265 nt des acmA-Gens (bis zur natürlichen EcoRI-Schnittstelle) rekonstruiert.

3.2.13 Klonierung von pJMLACM1

Um die als Fusionspunkt vorgesehene Agel-Schnittstelle in den für das Threonin-Modul der ACMSII kodierenden Abschnitt des *acmB*-Gens einzubringen, wurde ein Teil dieses Gens unter Verwendung der Primer man230402A und man250402B amplifiziert, wobei eine *Hin*dlII-Schnittstelle an bp 2504 und eine Agel-Schnittstelle an bp 2926 eingeführt wurden. Das erhaltene PCR-Produkt wurde als *Hin*dlII-Agel-Fragment in pSL1180 (Δ HindlII/AgeI) kloniert, es resultierte pAPage. Der für die Thiolierungsdomäne der ACMSII kodierende Bereich des *acmB*-Gens wurde durch PCR mit den Primern man250402C und man230402D unter Einführung einer Agel-Schnittstelle an bp 2926, eines Stopcodons an bp 3217 und einer *Xbal*-Schnittstelle an bp 3220 amplifiziert und als Agel-*Xbal*-Fragment in pSL1180 (Δ Agel-*Xba*I) kloniert, es resultierte pTPage. pTPage wurde durch Restriktion mit Agel und *Hin*dIII linearisiert, durch Einbringen des 0,4 kb-*Hin*dIII-Agel-Fragment gewonnen werden, das pIOACM53 (Δ Ascl/XbaI) zu pJMLACM1 komplettierte.

3.2.14 Klonierung von pJMLACM2

Um die als Fusionspunkt vorgesehene *Pst*I-Schnittstelle in den für das Threonin-Modul der ACMSII kodierenden Abschnitt des *acmB*-Gens einzubringen, wurde ein Teil dieses Gens unter Verwendung der Primer man230402A und man230402B amplifiziert, wobei eine *Hind*III-Schnittstelle an bp 2504 und eine *Pst*I-Schnittstelle an bp 2917 eingeführt wurden. Das erhaltene PCR-Produkt wurde als *Hind*III-*Pst*I-Fragment in pSP72 (Δ*Hind*III/PstI) kloniert, es resultierte pAP-LQ. Der für die Thiolierungsdomäne der ACMSII kodierende Bereich des *acmB*-Gens wurde durch PCR mit den Primern man230402C und man230402D unter Einführung einer *Pst*I-Schnittstelle an bp 2917, eines Stopcodons an bp 3217 und einer *Xba*I Schnittstelle an bp 3220 amplifiziert und als *Pst*I-XbaI-Fragment in pSP72 (Δ*Pst*I-XbaI) kloniert, es resultierte pTP-LQ. Durch Spaltung mit *Pst*I und *Hind*III wurde pTP-LQ linearisiert, das Insert aus pAP-LQ wurde als *Hind*III-PstI-Fragment eingebracht, um pAT-LQ zu erhalten. Das Insert aus pAT-LQ (mit dem *Pst*I-Fusionspunkt) wurde als *Asc*I-XbaI-Fragment in pJMLACM1 (aus dem zuvor der entsprechender Teilbereich mit AgeI-Fusionspunkt durch Spaltung mit AscI und XbaI entfernt worden war) eingebracht. Man erhielt pJMLACM2.

3.2.15 Klonierung von pJMLACM5

Durch PCR mit den Primern man230502A und man230502B an subklonierter DNA aus dem Actionomycin-Biosynthesegencluster von *Streptomyces chrysomallus* wurde ein Teil des *acmB*-Gens (bp 2944 bis 5080) unter Einführung einer künstlichen Agel-Schnittstelle und einer künstlichen Xbal-Schnittstelle amplifiziert. Durch Subklonieren des Agel-Xbal-Fragments in pSL1180 erhielt man pTplusA. Nach Spaltung von pTplusA mit *Hind*III und Agel wurde das Insert aus pAPage (siehe Klonierung von pJMLACM1) als *Hind*III/Agel-Fragment eingebracht, es resultierte pATplusA. Durch Spaltung von pJMLACM1 mit Ascl und Xbal wurde der 3'-seitige Abteil von *jmlacm1* entfernt und durch das aus pATplusA als Ascl-Xbal-Fragment entnommene *insert* ersetzt, man erhielt pLila. Der für das 3'-Ende von *acmC* kodierende Anteil von *acm53* wurde als *BsrGI-Xbal*-Fragment aus pACM53 entnommen und in pLila (Δ*BsrGI/Xbal*) eingefügt, man erhielt pJMLACM5.

3.2.16 Klonierung von pJMLMyx-1

Durch PCR mit den Primern man130802A und man130802B an subklonierter DNA aus dem Myxothiazol-Biosynthesegencluster von *Stigmatella aurantiacia* wurde ein Fragment des *mtaD*-Gens unter Einführung einer 5'-seitigen Agel-Schnittstelle und einer 3'-seitigen Xbal-Schnittstelle amplifiziert, das Amplifikat wurde nach Spaltung mit Agel und Xbal in pAPage (ΔAgel/Xbal) kloniert, man erhielt pAlrik.

Aus dem Cosmid E-25 (Silakowski *et al.*, 2001) wurde durch Spaltung mit EcoRV und BsrGI ein 6-kb-Fragment des *mta*D-Gens eluiert und in pSL1180 subkloniert, man erhielt pRufus. Durch PCR mit den Primern man140802A und man140802B an einem Subklon von genomischer DNA aus *Stigmatella aurantiacia* wurde der 3'-Bereich des *mta*D-Genes unter Einführung einer *Xba*I-Schnittstelle hinter dem Stopcodon der Translation amplifiziert und nach entsprechender Spaltung als EcoRV-XbaI-Fragment in pBlueskript II SK(+) subkloniert, man erhielt pHelme. Das Insert von pRufus wurde als BsrGI-EcoRV-Fragment freigesetzt und in pHelme (Δ EcoRV/BsrGI) kloniert, man erhielt pLucy. Das Insert aus pAlrik wurde durch Spaltung mit EcoRV und BsrGI freigesetzt, diese beiden Fragmente wurden ligiert und in pJMLACM1 (Δ AscI/BsrGI) kloniert, man erhielt pJMLMyx1.

3.2.17 Klonierung von plOacmA

Aus pACM10 (Pfennig *et al.*, 1998) wurde durch entsprechenden Restriktionsverdau ein 1212 bp-EcoRI/Bg/III-Fragment gewonnen, welches das *acm*A-Gen ab nt 264 sowie 3'-seitig eine zusätzliche His₆-kodierende Sequenz umfasste. Dieses Fragment wurde in pSP72 (ΔEcoRI/Bg/III) kloniert, man erhielt pIO7601-1. Ein 964 bp Sall/EcoRI-Fragment, entsprechend dem gesamten intercistronischen Bereich zwischen *acm*A und *acm*B zuzüglich der ersten 264 nt des *acm*A-Genes und der ersten 265 nt des *acm*B-Genes, wurde aus pPA1sub27 (Pfennig *et al.*, 1998) gewonnen und in pIO7601-1 (ΔSall/EcoRI) kloniert, man erhielt pIO11601-3. In pIO11601-3 ist die gesamte *acm*A-Sequenz zuzüglich des artifiziellen His₆-kodierenden Bereiches enthalten. Durch Spaltung mit von pIO11601-3 mit Bg/II wurde ein 1925 bp großes Bg/II-Fragment erhalten, das in mit Bg/II linearisiertes pSPIJ005 kloniert wurde. Man erhielt die Promotor-Testkonstrukte pIOacmA und pIOacmArev, die sich nur hinsichtlich der Orientierung der Bg/II-Bg/II-Kassette zum Plasmidrumpf unterschieden (Abb. 3.2.17-1).



Abbildung 3.2.17-1: Herleitung der Promotor-Testkonstrukte plOacmA und plOacmArev. Dargestellt ist ein 12 kb Fragment aus dem Actinomycinsynthetasegencluster aus S. chrysomallus, das die NRPS-Gene beherbergt (oben). Das herausgezeichnete Insert (mittig) besteht aus dem Promotor-Bereich sowie dem anschließenden acmA-Gen, das mit einer künstlichen 3'-seitigen His₆-codierenden Sequenz versehen wurde (daher mit acmA* bezeichnet). Dieses Insert wurde als Bg/II-Bg/II-Fragment in mit Bg/II linearisiertes pSPIJ005 eingebracht. Dabei wurden beide möglichen Orientierungen des Inserts zum Plasmidrumpf erhalten wurden (Restriktionskarten der Promotor-Testkonstrukte, unten).

3.2.18 Klonierung von plOacmB

Um den intercistronischen Bereich zwischen den NRPS-Genen des Actinomycingenclusters inklusive der ersten 54 bp des acmB-Gens zu erhalten, wurde pIO7601-1 mit PstI/Bg/II verdaut (die PstI-Schnittstelle 5'-seitig des so erhaltenen Promotorbereiches leitet sich vom Polylinker von plO7601-1 ab). Das resultierende PstI-BgIII-Fragment wurde in pACM46 (APstI/BgIII) eingebracht, man erhielt plOacmBred. Durch die Pstl-Bglll-Spaltung von pACM46 waren nicht nur der mel-Promotor und die anschließenden erst 54 bp von acmB entfernt worden, sondern auch ein acmBinternes 5.1 kb-Bg/II-Fragment (entsprechend nt 54 bis nt 5177 bp des acmB-Gens). Dieses musste zur Rekonstruktion des acmB-Gens in die singuläre Bg/II Schnittstelle von plOacmB-red eingebracht werden, dadurch erhielt man plOacmB.

3.3 Umgang mit Mikroorganismen

3.3.1 Kultivierung von Streptomyces sp.

Streptomyces lividans und Streptomyces chryosmallus wurden auf HMM-Festmedium gehalten, Transformandenstämme von S. lividans auf R5-Festmedium (unter Zusatz des Selektionsmarkers Thiostrepton). Das für die Erzeugung von Rohextrakten oder zur Protoplastierung eingesetzte Mycel wurde durch Anzucht in Flüssigkulturen erhalten. S. lividans-Transformandenstämme wurden dazu in YEME-Medium kultiviert, S. chrysomallus in verschiedenen synthetischen und komplexen Medien. Das Flüssigmedium wurde mit einer Sporensuspension (S. chrysomallus und S. lividans) bzw. mit mechanisch zerkleinertem Mycel der auf Festmedium gewachsenen S. lividans-Transformandenstämme beimpft. Die Kultivierung erfolgte in Erlenmeyerkolben (100 ml Medium in 300 ml-Kolben), in die zur Verbesserung des Sauerstoffeintrags eine Edelstahlspirale als Schikane eingebracht worden war. Inkubiert wurde in einem Schüttelinkubator (New Brunswick G25) bei 250 rpm und 26-30°C. Die Dauer der Kultivierung variierte zwischen 2 und 8 Tagen.

Streptomyces lividans wurde, wenn eine nachfolgende Protoplastierung vorgesehen war, in YEME-Medium unter Glucose-Supplementierung und Zusatz von Glycin bis zu einer finalen Konzentration von 0,5% (w/v) angezüchtet. Das Mycel wurde nach etwa 48 h Wachstum durch Zentrifugation geerntet.

Bei der Kultivierung von S. lividans-Transformandenstämmen wurde dem YEME-Medium Thioestrepton (f.c. 5 µg/ml) zugesetzt.

Bei der Expression von rekombinanten NRPS-Genen unter Kontrolle des mel-Promotors wurden die Kulturen 72 h bei 29°C und 250 rpm gewachsen, das YEME-Medium wurde in diesem Fall mit Glucose supplementiert. Zur Expression von rekombinanten NRPS-Genen unter Kontrolle des *acmA*-Promotors wurden die Kulturen 96 h bei 26°C und 250 rpm in Maltose-supplementiertem YEME-Medium gewachsen.

3.3.2 Kultivierung von E. coli

E. coli-Stämme wurde in dYT-Medium bei 37°C kultiviert. Für Übernachtkulturen wurden jeweils 2 ml dYT-Medium von Platte, aus einem Glycerol-stock oder von einer Stichkultur angeimpft. Die Inkubation erfolgte bei 37°C im Inkubationsschüttler. Um größere Mengen Zellmaterial (zur Präparation von transformationskompetenten Zellen oder zur Gewinnung von Protein-Rohextrakten) zu gewinnen, wurde diese Übernachtkultur zum Animpfen einer Tageskultur (im Maßstab 1:200) benutzt.

Zur längerfristige Lagerung von E. coli-Stämmen wurde den Übernachtkulturen Glycerin (f.c. 25%) zugesetzt, die Lagerung erfolgte bei –80°C.

3.3.3 Transformation von E. coli

Zur Transformation eines Ligationsansatzes in *E. coli* wurden die aliquotierten kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut, 200 µl der Zellsuspension wurden zu dem auf Eis vorgekühltem Ligationsansatz (Volumen des Ligationsansatzes: 35 µl) pipetiert. Es wurde 30 min auf Eis inkubiert, dann wurden die Zellen für 1 min auf 42°C erwärmt. Nach diesem Hitzeschock zur Steigerung der Transformationsrate wurden die Zellen rasch auf Eis abgekühlt. Zur Regeneration und zum Aufbau der durch das Plasmid vermittelten Ampicillin-Resistenz wurde der Transformationsansatz mit 1 ml dYT vermengt und eine halbe Stunde bei 37°C unter fortwährendem Mischen inkubiert. Danach wurde der Transformationsansatz auf ampicillinhaltige dYT-Platten ausgestrichen. Nach Wachstum über Nacht bei 37°C konnten die Kolonien in Flüssigkultur überführt werden.

3.3.4 Transformation von Streptomyces sp.

Zur Transformation von Streptomyces sp. wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Protokoll zur PEG-Transformation von Protoplasten verwendet (Kieser et al, 2000). Die Anzucht des zu transformierenden Stammes erfolgte in YEME-Medium (S. lividans) oder HMM-Medium (S. chrysomallus), wobei dem Medium Glycin bis zu einer finalen Konzentration von 0,5% (w/v) zugesetzt war. Die noch nicht voll ausgewachsene Kultur wurde durch Zentrifugation geerntet (5 min, 4000 g). Das pelletierte Mycel wurde in Sucrose-Lösung gewaschen und nach erneutem Pelettieren in Lysozym-Lösung aufgenommen. Zur Protoplastierung wurde etwa 30 min bei 29°C inkubiert, wobei das Fortschreiten der Protoplastierung unter dem Lichtmikroskop verfolgt wurde. Bei Erreichen eines befriedigenden Protoplastierungsgrades wurde das restliche Mycel durch Passieren des Protoplastierungsansatzes über sterile Sporenfilter entfernt. Die erhaltene Protoplasten-Präparation sterile wurde auf Mikrozentrifugenröhrchen verteilt und pelletiert. Nach Resuspendieren in P-Puffer wurde der Ansatz mit etwa 0,4 µg Plasmid-DNA vermischt und mit 400 µl frischer PEG1000-Lösung 45 s bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Transformationsansätze mit P-Puffer verdünnt (Gesamtvolumen etwa 2 ml), die Protoplasten wurden pelettiert, mit P-Puffer gewaschen und zum Ausplattieren auf R5-Platten in 1 ml P-Puffer aufgenommen. Die beimpften R5-Platten wurden 16-20 h bei 29°C inkubiert und dann mit einer wässrigen Thiostrepton-Suspension überschichtet (f.c. im Festmedium 50 µg/ml). Nach drei Tagen weiterer Inkubation bei 29°C wurden Einzelkolonien auf R5-Selektionsmedium ausgestrichen (f.c. 50 µg/ml TSR).

3.3.5 Präparation transformations-kompetenter E. coli-Zellen

*E. coli-*Zellen wurde durch Behandlung mit Calciumchlorid-Lösung für die Transformation vorbereitet (Mandel *et al.*, 1970). Hierzu wurden 3 ml dYT mit *E. coli* aus einer Glycerinkultur angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. Mit dieser Übernachtkultur wurde eine Hauptkultur (dYT und Vorkultur im Verhältnis von 1:50) angeimpft. Die Hauptkultur wurde bei 37°C im Schüttelinkubator belassen, bis eine OD₆₀₀ von 0,6 erreicht war, dies erforderte etwa 4 h Wachstum. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugieren (Haereus-Zentrifuge, 10 min bei 4°C und 4000 upm) geerntet und mit CaCl₂- Lösung (50 mM) gewaschen. Nach dem Waschen und erneuten Abzentrifugieren (Hereaus-Zentrifuge, 5 min bei 3500 upm) wurden die Pellets in einem calciumchloridhaltigem Puffer (50 mM CaCl₂, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 15% (v/v) Glycerin) aufgenommen und in vorgekühlte Mikrotubes aliquotiert. Nach vier Stunden auf Eis wurden die Aliquots bis zur Transformation bei -80°C gelagert.

3.3.6 Kurzzeitfütterungsexperimente zur Untersuchung auf in-vivo-Produktbildung

Die *in vivo*-Produktion von Peptiden durch die rekombinanten Peptidsynthetasen ACM53 und JMLACM5 wurde durch *short-term*-Inkorporation mit [¹⁴C]-Threonin oder [¹⁴C]-Valin untersucht. Da *S. lividans* keine von den Actinomycinsynthetasen als Substrat akzeptierten Aryl-Carbonsäuren produziert, wurden den Kulturen während des *short term*-Experimentes außerdem geeignete Aryl-Carbonsäuren zugesetzt.

Der entsprechende *S. lividans*-Transformandenstamm wurde in YEME-Flüssigmedium unter TSR-Selektion kultiviert. Die Anzucht erfolgte in 300 ml Spiralkolben mit je 100 ml Kultur pro Kolben auf einem Schüttelinkubator, Temperatur und Wachstumsdauer variierten (26-30°C, zwei bis sechs Tage). Für jeden im Kurzzeitfütterungexperiment vorgesehenen Ansatz wurde das Mycel aus 5 ml Kultur durch Zentrifugation gererntet, mit Leitungswasser gewaschen und in 3,5 ml Leitungswasser resuspendiert. Dem gewaschenen Mycel wurde 1 µCi einer ¹⁴C-markierten Aminosäure (Thr oder Val) zugefügt, außerdem wurde optional eine Aryl-Carbonsäure zugegeben, wobei die eingestellte Substratkonzentration entsprechend der Tabelle 3.4.6-1 von Substrat

zu Substrat variierte. Es wurde 2 h bei 30°C auf dem auf dem Inkubationsschüttler inkubiert. Um die Bildung von Aroyl-Peptiden nachzuweisen, wurde der Reaktionsansatz nach Ablauf der Inkubationszeit mit HCI angesäuert und mit Essigsäurethylester extrahiert, die Extrakte wurden eingeengt und einer Dünnschichtchromatographie unterzogen.

Aryl-Carbonsäure	f.c.
p-Toluylsäure	1 mM
4-Methyl-3-Hydroxy-Benzoesäure (4-MHA)	1 mM
4-Methyl-3-Hydroxy-Anthranilsäure (4-MHB)	0,5 mM
3-Hydroxy-Anthranilsäure (3-HA)	0,5 mM
4-Hydroxy-Benzoesäure	2 mM
4-Ethyl-Benzoesäure	2 mM
m-Toluylsäure	2 mM

Tabelle 3.4.6-1: Konzentrationen der bei Kurzzeitfütterungsexperimenter
zugesetzten Arvl-Carbonsäuren

3.4 Proteinchemische Arbeitsmethoden

3.4.1 Proteingehaltsbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach Bradford (Bradford, 1976). Hierzu wurden auf einer Mikrotiterplatte 10 µl der zu bestimmenden Proteinlösung mit 100 µl Bradford-Reagenz versetzt. Die Proben wurden dann mit auf dem ELISA-Reader bei 570 nm vermessen, als Standard dienten verschieden konzentrierte BSA-Lösungen.

3.4.2 SDS-Gelelektrophorese

Die analytische Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht erfolgte mit einer SDS-Page nach Laemmli (Laemmli, 1970). Eingesetzt wurden 5 bis 10%ige Polyacrylamidgele in einem Hoefer-Minigelapperat. Die Proteinproben wurden mit dem PAGE-Probenpuffer im Verhältnis 1:1 gemischt und anschließend für 10 min im kochenden Wasserbad oder auf dem 95°C warmen Thermomixer erhitzt, danach auf das Gel aufgetragen. Als Größenstandard diente der Marker SDS-6h (Sigma; enthält Markerproteine im Größenbereich von 29 bis 205 kDa) oder eine Probe der Enniatinsynthetase (Zocher *et al.*, 1982). Die Elektrophorese erfolgte bis zum vollständigen Einlauf der Proteinproben in das Gel bei einer konstanten Stromstärke von 10 mA, danach bei 20 mA. Die Gele wurden mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt.

3.4.3 Western-Blot-Analyse

Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der durch Immunoblotanalyse zu untersuchenden Proben in SDS-Polyacrylamidgelen (nach Laemmli, 1970) wurden die Proteine unter Nutzung einer semi-dry-blotting-Apparatur (Biometra) auf eine PVDF-Membran übertragen. Der Proteintransfer erfolgte bei einer Stromdichte von 4 mA/cm². Nach dem Transfer wurde die Membran zum Blocken freier Bindungsstellen mit einer 3%-igen BSA-Lösung behandelt. Nach Waschschritten in TBS-Tween und TBS erfolgte die Detektion der mit hexa-Histidin-Sequenzen versehenen Proteine durch einen primären Antikörper (Mouse IG₁, Qiagen, eingesetzt in 1:2000-Verdünnung in 3%-iger BSA-Lösung). Die Detektion des primären Antikörpers erfolgte mit einem Anti-Mouse-IgG-Antikörper-Alkalische-Phosphatase-Konjugat (Sigma, eingesetzt in 1:5000-Verdünnung in TBS). Die Entwicklung des Blot erfolgte in NBT/BCIP-Substratlösung (0,25 mg/ml NBT, 0,15 mg/ml BCIP).

3.4.4 Bestimmung der Enzymaktivtät durch Thioester-Bildung

Die Aktivität von modularen Peptidsynthetasen wurde durch die Fähigkeit der Module, sich in Anwesenheit von ATP kovalent mit ihren Substraten zu beladen, bestimmt. Die Detektion erfolgte durch den Einsatz radioaktiv markierter Substrate. Um die Menge des kovalent gebundenen Substrates bestimmen zu können, wurden die Synthetasen nach der Inkubation sauer gefällt, der Niederschlag wurde intensiv gewaschen, um ungebundenes Substrat quantitativ abzutrennen.

Gemäß der Vorschrift von Keller (1987) wurden 100 µl der Enzymlösung mit 1 M MgCl₂-Lösung und 0,1 M ATP-Lösung bis zu Endkonzentrationen von 16 mM MgCl₂ und 12,5 mM ATP versetzt, außerdem wurde die radioaktive Aminosäure (etwa 0,3 µCi ¹⁴C-Threonin oder ¹⁴C-Valin) zugegeben. Das Endvolumen lag bei 120 µl. Nach Inkubation (15 min, 30°C) wurde das Protein durch Zugabe von 2 ml 7%iger TCA präzipitiert, der Niederschlag wurde über Mischester-Membranfilter (ME-25, Schleicher & Schuell) abgesaugt und mit 7%iger TCA-Lösung gewaschen. Die Quantifizierung des enzymgebundenen Substrates erfolgte durch Szintillationszählung in einem Wallac-Szintillationszähler.

3.4.5 Bestimmung der Enzymaktivtät durch die substratabhängige ATP/[³²P]-PP_i-Austauschreaktion

Die Aktivität von adenylierenden Enzymen kann anhand der Rückreaktion, bei der aus dem Substrat-Adenylat und PP_i das Substrat und ATP rückgebildet werden, mittelbar bestimmt werden. Zum Nachweis des rückgebildeten Adenylates wird dem Reaktionsansatz [³²P]-PP_i zugesetzt, das im Zuge der Rückreaktion in markiertes ATP überführt wird. ATP absorbiert bei niedrigem pH im Gegensatz zu PP_i an Aktivkohle, dadurch ist eine quantitative Abtrennung des unumgesetzten PP_i möglich. Die Menge des zu ATP umgesetzten PP_i wird durch Szintillationszählung der durch Abfiltrieren und Waschen erhaltenen Aktivkohle bestimmt. Die Austauschreaktionen wurden hier in einem Gesamtvolumen von 220 µl durchgeführt, wobei 100 µl ATP-Reaktionsmix und 20 µl Substratlösung eingesetzt wurde. Von der zu testenden Proteinfraktion wurden zwischen 50 und 100 µl eingesetzt, inkubiert wurde zwischen 150 s und 10 min bei 30°C im Wasserbad. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 ml Stopmix beendet. Die Aktivkohle wurde über Glasfaserfilter (GF92, Schleicher & Schuell) abgesaugt und mit Wasser gewaschen.

Da die im Rahmen dieser Arbeit durch die ATP-Austauschreaktion untersuchten Proteinfraktionen in der Regel unspezifische Austauschreaktionen katalysierten, musste von jeder zu testenden Fraktion eine Kontrollmessung ohne Zusatz des Substrates mitgeführt werden. Der substratabhängige ATP-Austausch wurde durch Subtraktion der in der Kontrollreaktion erzielten Zählrate von der unter Substratzusatz erzielten Zählrate bestimmt.

3.4.6 Herstellung von Zellextrakten

Analytischer Maßstab

Die Expression rekombinanter NRPS-Gene durch Transformandenstämme von S. *lividans* wurde durch gelelektrophoretische Auftrennung von Zellextrakten nachgewiesen. Dazu wurde, je nach zu diesem Zeitpunkt gebildeter Biomasse, das Mycel aus 2 bis 6 ml Submerskultur durch Zentrifugation geerntet, mit Wasser gewaschen und in Zellpuffer B50 resuspendiert. Der Aufschluss erfolgte durch Sonifikation (Labsonic U, Braun, Melsungen).

Präparativer Maßstab

Die Herstellung von Zellextrakten für nachfolgende Proteinpräparationen erfolgte mit Hilfe einer French-Press-Zelle (AMINCO, Silver Spring). Dazu wurde das wie in Abschnitt 3.3.1 beschrieben submers gewachsene Mycel durch Filtration geerntet, mit Leitungswasser gewaschen und im jeweiligen Aufschlusspuffer (Puffer A oder C) resuspendiert. Der Aufschluss erfolgte durch zweimaliges Passagieren durch die French-Press-Zelle bei einem Betriebsdruck von maximal 16000 psi. Dem so gewonnenen Rohextrakt wurden DNase I (f.c. 0,2 mg/ml) und MgCl₂ zugegeben (f.c. 15 mM), es wurde 10 min unter leichtem Rühren auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Zellextrakt 15 min bei 25000 g zentrifugiert, der Überstand wurde abdekantiert und im weiteren Präparationsprozess eingesetzt.

3.4.7 PEI-Fällung

Zur weiteren Klärung der wie unter Abschnitt 3.4.6 beschrieben hergestellten präparativen Zellextrakte wurde eine Fällung mit PEI (Polyethylenimin) vorgenommen. Dazu wurde der nach Zentrifugation des Rohextraktes abdekantierte Überstand zunächst durch Zugabe von 5 M NaCI-Lsg. auf eine Endkonzentration von 825 mM NaCI eingestellt. Anschließend erfolgte die tropfenweise Zugabe von 10%iger (w/v) PEI-Lösung bis zu einer finalen Konzentration von 0,3 % (w/v).

3.4.8 Ammoniumsulfatfällung

Bei der Präparation der bi- und trimodularen rekombinanten Peptidsynthetasen wurde der Proteinextrakt vor der Gelfiltration an AcA-34 durch eine Ammoniumsulfatfällung aufkonzentriert. Dazu wurde dem Proteinextrakt unter leichtem Rühren vorsichtig eine kalt gesättigte Ammoniumsulfatlösung bis zu einer finalen Sättigung von 55% zugegeben. Die Fällung wurde anschließend mindestens 2 h auf Eis inkubiert, das Präzipitat wurde durch Zentrifugation bei 25000 g bei 4°C pelletiert und anschließend für die Gelfiltration in 2 Pellet-Volumen Puffer B resuspendiert.

3.4.9 Chromatographische Trennungsverfahren

Gelfiltration an UltroGel AcA34

Zur Präparation der mehrmodularen rekombinanten Peptidsynthetasen ACM44-53 aus partiell geklärten Proteinextrakten von entsprechenden S. lividans-

Transformandenstämmen wurde standardmäßig eine Gelfiltration an UltroGel AcA34 (Säulendimension 2x48 cm) vorgenommen. Vor jedem Gelfiltrationslauf wurde die Säule mit mindestens drei Säulenvolumen Puffer В equilibriert. Der ΖU chromatographierende Proteinextrakt durch war zuvor partielle Ammoniumsulfatfällung (finale Sättigung 55%) und Zentrifugation pelletiert worden und wurde unmittelbar vor der Chromatographie in 2 Pelletvolumen Puffer B aufgenommen, es wurden maximal 8 ml resuspendierter Proteinextrakt auf die Gelfiltrationssäule aufgegeben und mit einer Flussrate von 0,4 ml/min eluiert, das Fraktionsvolumen betrug 5 ml. Abb. 3.3.9-1 zeigt Aktivitätsprofil und den Verlauf des Proteingehaltes am Beispiel der Gelfiltration von ACM46.



Abbildung 3.4.9-1: Protein- und Aktivitätsprofil bei der Gelfiltration von ACM46 an AcA-34. Dargestellt ist der Verlauf der Aktivität im Thioester-Test mit ¹⁴C-Threonin (Rechtecke) und ¹⁴C-Valin (Kreise) sowie die Proteinkonzentration (gepunktete Linie) in den Fraktionen. In die Graphik eingefügt ist ein Coomassie gefärbtes 5% Polyacrylamid-Gel (SDS-PAGE) der Fraktionen 14 bis 26, zur Größenabschätzung wurde der Protein-Molekulargewichtsmarker SDS-6H (Sigma) eingesetzt (äußerte linke Spur).

Anionenaustauscherchromatographie an Q-Sepharose

Zur weiteren Aufreinigung im Zuge der Präparation der mehrmodularen rekombinanten Peptidsynthetasen ACM44-53 wurde eine Anionenaustauscherchromatographie an Q-Sepharose FF durchgeführt. Die dazu eingesetzten Proteinfraktionen waren zuvor durch Gelfiltration an UltroGel AcA34 vorgereinigt und entsalzt worden. Die vereinigten Fraktionen wurden mit einem Volumen Puffer B verdünnt und auf eine Q-Sepharose FF - Säule aufgebracht. Die Säule wurde mit Puffer B und Puffer B + 150 mM NaCl gewaschen, anschließend wurde das zu präparierende Enzym mit Puffer B + 300 mM NaCl eluiert, dabei wurden Fraktionen von jeweils 2 ml gesammelt. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden durch eine Proteingehaltsbestimmung nach Bradford identifiziert, vereint und als Aliquots zu je 2 ml bei -80°C gelagert.

NaCl im	Eluiertes Volumen	Proteingehalt	Valin-bindende	Valin-bindende
Elutionspuffer			Aktivität in 100 µl	Gesamtaktivität in
			Präparation	dieser Fraktion
[mM]	[ml]	[mg/ml]	[pmol]	[pmol]
150	18	0,6	0,06	10
300	24	2,0	0,72	175
500	8	0,8	0,04	3

Tabelle 3.4.9-1: ATP-abhängige Thioesterbildung nach Fraktionierung eines Proteinextraktes aus S. lividans/pACM46 an Q-Sepharose

Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Matrix

Die Affinitätschromatographie wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eingesetzt, um rekombinante Proteine, deren kodierende Gene mit einer hexa-Histidinkodierenden Sequenz (His₆-Affinitäts-Tag) versehen waren, von Begleitproteinen abzutrennen. Dies geschah durch Chromatographie an einer Ni-NTA-Agarose-Matrix, von der die gebundenen Proteine durch Anlegen eines Imidazol-Gradienten eluiert wurden.

Das Beladen des Ni-NTA-Säulenmaterials erfolgte bei einem pH-Wert von pH 8,0 (Ni-NTA-Laufpuffer). Die Säule wurde mit einem Puffer mit erniedrigtem pH-Wert (Ni-NTA-Waschpuffer, pH 6), gewaschen, um unspezifisch gebundene Begleitproteine zu eluieren. Eluiert wurde mit einem Stufengradienten (10 mM, 100 mM und 250 mM Imidazol in Ni-NTA-Laufpuffer). Es wurden Fraktionen von je 1 ml gesammelt, die proteinführenden Fraktionen einer Stufe wurden vereint.

3.4.10 Trennungsgang zur Proteinpräparationen von multimodularen rekombinanten Peptidsynthetasen nach heterologer Expression der kodierenden Gene in S. *lividans*

Zur Präparation der mehrmodularen rekombinanten Peptidsynthetasen ACM44-53 aus Mycel der entsprechenden S. lividans-Transformandenstämme wurde ein einheitlicher verwendet. wurde Reinigungsgang Dazu der ieweilige Transformandenstamm wie in Abschnitt 3.3.1 beschrieben in Flüssigkultur gezüchtet und durch Filtration geerntet. Es wurde unter Einsatz einer French-Press-Zelle ein Rohextrakt erzeugt (siehe Abschnitt 3.4.6), der durch Zentrifugation und PEI-Fällung geklärt wurde. Nach partieller Ammoniumsulfatfällung wurde der resuspendierte Proteinextrakt einer Gelfiltration an AcA-34 (Abschnitt 3.4.8) und einer Anionenaustauscherchromatographie an Q-Sepharose FF (Abschnitt 3.4.9) unterzogen.

3.4.11 Trennungsgang zur Quantifizierung von Enzymaktivitäten der

Actinomycinsynthetasen in S. chrysomallus und S. lividans/plOacmA

Die während der Aufnahme von Wachstumskurven durch Filtration geernteten Kulturproben wurden bis zur Aufarbeitung bei –80°C gelagert. Zur Aufarbeitung wurden die Mycel-Proben in 2 Volumen Puffer C resuspendiert, unter Einsatz einer French-Press-Zelle wurden Rohextrakte gewonnen (vgl. Abschnitt 3.4.6). 500 µl der durch Zentrifugation geklärten Rohextrakte wurden auf vorher mit Puffer C equilibrierte DEAE-Cellulose gefüllte Pasteurpipetten (Säulenvolumen 1,5 ml) aufgetragen. Unter den gewählten Bedingungen (pH = 6,8) bindet die ACMSI nicht an DEAE-Zellulose und kann so von einem Großteil der Begleitproteine abgetrennt werden (Keller und Schlumbohm, 1992). Eluiert wurde mit Puffer C, es wurden Fraktionen von jeweils 1 ml gesammelt. Der Verlauf der ACMSI-Aktivität in den Fraktionen wurde anhand der 4-MHB-abhängigen ATP-Austauschreaktion festgestellt. Die ACMSI-haltigen Fraktionen wurden – separat für jede Probe aus der Wachstumskurve – vereint, die ACMSI-Aktivität in den pools wurde anhand der 4-MHB-abhängigen ATP-Austauschreaktion festgestellt.

Bei der Untersuchung von Proben aus S. *chrysomallus* verblieben die multimodularen Actinomycinsynthetasen ACMSII und ACMSIII während der Eluierungsschritte mit Puffer C an der DEAE-Zellulose und konnten nach Abtrennung der ACMSI mit Puffer C (300 mM NaCI) eluiert werden. Die ACMSII/ACMSIII-haltigen Fraktionen wurden durch Bestimmung des ValyI-Enzym-Thioesters identifiziert und gepoolt, die ACMSII+ACMSIII-Aktivität in den *pools* wurde anhand des ValyI-Enzym-Thioesters quantifiziert.

3.4.12 Trennungsgang zur Quantifizierung der Aktivitäten plasmid- und chromosomal kodierter ACMSI in S. chryosmallus / plOacmA

Da die auf dem Plasmid plOacmA befindliche Kopie des *acm*A-Gens mit einer künstlichen His₆-kodierenden Sequenz ausgestattet ist, konnte das Genprodukt des plasmid-gestützen *acm*A-Gens (ACMSI+His₆) vom Genprodukt des chromosomal gelegenen *acm*A-Wildtypgens abgetrennt werden. Dies geschah durch Affinitätschromatographie an NiNTA-Matrix. Dazu wurde *S. chrysomallus* (plOacmA) wie in Abschnitt 3.3.1 beschrieben in HMM-Flüssigmedium kultiviert. Ein wie in Abschnitt 3.4.6 angegeben hergestellter Zellextrakt wurde über DEAE-Zellulose-Minisäulen vorfraktioniert. Die ACMSI-haltigen Fraktionen wurden durch 4-MHB-

abhängigen ATP-[32P]PPi-Austausch bestimmt, vereinigt und einer Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Matrix unterzogen.

3.4.13 Untersuchung von ACM46 auf Epimeraseaktivität

10 pmol Acm46 wurden in einem Gesamtvolumen von 630 µl in Gegenwart von 15 mM ATP, 15 mM MgCl₂, 2 mM Thr und 1,5 µCi ¹⁴C-Val 30 min bei 30°C inkubiert. Das Protein wurde mit 10%iger TCA gefällt (1 h auf Eis). Das nach Zentrifugation erhaltene Pellet wurde nacheinander mit 7%iger TCA, 3,5%iger TCA und Ethanol gewaschen und anschließend bei 37°C luftgetrocknet. Zur Abspaltung des Dipeptides vom Enzym wurde ein 9+1-(v/v)-Gemisch aus Ameisensäure und H₂O₂ zugegeben, nach 4 h Inkubation wurde der Ansatz bis zur Trockne eingeengt, das erhaltene Pellet wurde in 40 µl Ameisensäure gelöst und auf eine Dünnschichtchromatographieplatte aufgetragen. Die DC wurde im Aminosäurelaufmittel entwickelt, die auf der DC-Platte aufgetrennten Produkte wurden im Autoradiogramm nachgewiesen.

3.4.14 Untersuchung von ACM44-56 auf Produktbildung und Thioesteraseaktivtät

Die rekombinanten Peptidsynthetasen ACM44, ACM46, ACM47, ACM48, ACM50, ACM54, ACM55 und ACM56 wurden im zellfreien System auf Produktbildung und Thioesteraseaktivtät untersucht. Die Proteinpräparationen der oben genannten Peptidsynthetasen wiesen unterschiedliche Synthetase-Konzentrationen auf. Da sie jedoch alle nach einem Standardprotokoll durch heterologe Expression ihrer kodierenden Gene und eine anschließende standardisierte Proteinpräparation dargestellt worden waren, erschien es sinnvoll, zur Untersuchung auf Thioesteraseaktivtät gleiche Volumina der angereinigten Proteinfraktionen einzusetzen, um vergleichbaren Konzentrationen an Begleitproteinen in den Reaktionsansätzen vorliegen zu haben.

Zur Aufnahme eines Reaktionsprofiles wurden 2,5 ml der entsprechenden Enzympräparation (zwischen 15 und 300 pmol Synthetase) in einem Gesamtvolumen von 4175 µl in Anwesenheit von ACMSI [3 nM], AcmACP [30 nM], p-Toluylsäure [2,4 mM], L-Threonin [2,4 mM], ATP [12 mM], MgCl₂ [18 mM], ¹⁴C-Valin [7 µM] und Glycerol [10% (w/v)] bei 30°C inkubiert. Nach verschiedenen Zeiten wurden Aliquots (jeweils 835 µl) entnommen. Die Aliquots wurden mit HCI angesäuert (bis etwa pH = 3) und mit EE extrahiert. Die organischen Phasen wurden zur Trockne eingeengt, in EE aufgenommen und auf DC aufgetragen. Die wässrigen Phasen wurden zur Proteinfällung mit einem Volumen 10%iger TCA versetzt, das Präzipitat wurde durch Zentrifugation pelettiert, nacheinander mit 7%iger TCA, 3,5%iger TCA und Ethanol gewaschen und anschließend bei 37°C luftgetrocknet. Die getrockneten Pellets wurden in 0,5 N Natronlauge aufgenommen und zur Verseifung der Thioesterbindungen 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde mit HCI angesäuert (bis etwa pH = 3) und mit EE extrahiert. Die organischen Phasen wurden zur Trockne eingeengt, in EE aufgenommen und auf DC aufgetragen. Die DC-Platten wurden im Aroyl-Dipeptid-Laufmittel entwickelt. Der Nachweis der Produktbanden erfolgte durch Autoradiographie, die Quantifizierung der Produktbanden durch Einsatz des ¹⁴C-DC-Scanners.

3.4.15 Untersuchung von ACM53 Produktbildung und Thioesteraseaktivtät

Die trimodulare rekombinante Peptidsynthetase ACM53 wurde im zellfreien System auf Produktbildung und Thioesteraseaktivtät untersucht; diese Testung erfolgte wie für ACM44 und Folgekonstrukte im vorangegangenen Abschnitt angegeben, nur dass hier auf den Zusatz von ACMSI und AcmACP verzichtet wurde.

3.4.16 Untersuchung von ACMA1FUS002 und ACMSII auf Produktbildung

15 pmol ACMSII wurden in einem Gesamtvolumen von 835 µl in Gegenwart von 12 mM ATP, 18 mM MgCl₂, 2,4 mM p-Toluylsäure sowie in Anwesenheit von entweder 30 nM ACMA1FUS002 oder 30 nM AcmACP und 3 nM ACMSI inkubiert; als Radiolabel wurde entweder ¹⁴C-Valin oder ¹⁴C-Threonin (2 µCi) zugesetzt, die jeweils andere Aminosäure wurde unmarkiert (f.c. 2,4 mM) zugesetzt. Die Ansätze wurden 90 min bei 30°C inkubiert, durch Zugabe von 2 ml 10%iger TCA (w/v) wurden die Proteine gefällt, das nach Zentrifugation erhaltene Protein-Pellet wurde mit 7%iger TCA, 3,5%iger TCA und EtOH gewaschen und getrocknet, sodann in 300 µl NaOH [0,5 N] aufgenommen und zur Verseifung der Thioesterbindungen 30 min bei RT inkubiert. Durch Zugabe von HCI wurde ca. pH 2 eingestellt. Nach zweifacher EE-Extraktion wurden die vereinten organischen Phasen zur Trockne eingedampft, die Rückstände wurden in EE aufgenommen und auf DC aufgetragen, die DC-Platte wurde im Aroyl-Dipeptid-Laufmittel entwickelt (siehe Abschnitt 3.5.1).

3.4.17 Untersuchung von ACM45 auf Produktbildung

8 pmol ACM45 wurden in einem Gesamtvolumen von 835 μl in Gegenwart von 12 mM ATP, 18 mM MgCl₂, 2,4 mM p-Toluylsäure inkubiert; als Radiolabel wurde entweder ¹⁴C-Valin oder ¹⁴C-Threonin (2 μCi) zugesetzt, die jeweils andere

56

Aminosäure wurde unmarkiert (f.c. 2,4 mM) zugesetzt. Als Kontrollansatz dienten ACMSII, AcmACP und ACMSI, die wie unter 3.4.15 eingesetzt wurden, auch die Versuchsdurchführung sowie die Aufarbeitung und Analyse der Reaktionsprodukte erfolgte wie dort angegeben.

3.4.18 Untersuchung von JMLMyx-1 auf Produktbildung

10 pmol JMLMyx-1 wurden in einem Gesamtvolumen von 795 µl in Anwesenheit von 12,5 mM ATP, 20 mM MgCl₂, 2,5 mM p-Toluylsäure oder 1,25 mM 4-MHB, 2 µCi ¹⁴C-Thr sowie in An- oder Abwesenheit von 2,5 mM Malonyl-CoA (in Puffer B) 2 h bei 30°C inkubiert. TCA-Präzipitation, Waschen und Trocknen des Pellets, Verseifung, Extraktion und Analyse der Produkte erfolgte wir im unter 3.4.15 beschrieben.

3.5 Analysemethoden für kurzkettige Peptide

3.5.1 Dünnschichtchromatographie

Zur Analyse der Aroyldipeptide wurde ein Gemisch aus Ethylacetat, n-Hexan und Essigsäure (5/5/1, v/v/v) als Laufmittel gewählt, Peptide und Aminosäuren wurden mit n-Butanol/Essigsäure/Wasser im Verhältnis 4/1/1 (v/v/v) chromatographiert. Die Chromatographie erfolgte auf Kieselgel 60 F₂₅₄ - Platten (20x20 cm). Die Spurbreite betrug 1,5 cm, zwischen den Spuren wurde jeweils mindestens 1 cm Abstand gelassen.

Der Nachweis der auf der DC aufgetrennten, radioaktiv markierten Produkte erfolgte durch Autoradiogramme oder den ¹⁴C-Detektor, synthetische Referenzen wurden über ihre UV-Adsorption nachgewiesen.

3.5.2 Identitätsnachweis für das Aroyldipeptid durch HPLC-Analyse

Die DC-Analyse der bei *in vitro*-Untersuchungen (siehe 3.4.13) und *in-vivo*-Untersuchungen auf Aroyl-Dipeptidbildung erhaltenen Extrakte erfolgt standardmäßig in Anwesenheit einer synthetischen Referenz des erwarteten Reaktionsproduktes p-Toluyl-Thr-Val. Um die Identität der mit der authentischen Probe co-migrierenden Produktbande weiter abzusichern, wurde eine Probe des von ACM50 gebildeten Enzymproduktes von der DC-Platte extrahiert (Extraktion mit MeOH, Nachextraktion mit MeOH/H₂O 1:1), zur Trockne eingeengt und in MeOH/H₂O aufgenommen. Die so erhaltene Probe (ca. 4000 cpm) wurde mit 30 µl (entsprechend einer OD von etwa 1,5) der nicht radioaktiven synthetischen Referenz vermischt und auf eine SuperPac PepS-Säule (Pharmazia) appliziert. Eluiert wurde mit einem 60 ml Gradienten aus Wasser und Acetonitril (beide mit 0,1% TFA) bis zu einem Gehalt von 60% Acetonitril. Die Flussrate lag bei 1 ml/min. Die synthetische Referenz konnte bei 260 nm Wellenlänge anhand ihrer UV-Absorption detektiert werden, wohingegen die Konzentration des Enzymproduktes so gering war, dass eine optische Detektion von vornherein ausgeschlossen war. Zum Nachweis des Enzymproduktes wurde das Eluat in Fraktionen zu 0,5 ml gesammelt, die enthaltene Aktivität wurde im Szintilationszähler bestimmt. Dabei wurde gefunden, dass die ¹⁴C-markierte Probe und die synthetische Referenz bei gleicher Retentionszeit eluierten.

3.5.3 Quantifizierung DC-gebundener Produktmengen

Die Auftrennung der in den Enzymassays erhaltenen Reaktionsprodukte erfolgte auf DC-Platte. Während zur qualitativen Auswertung Autoradiogramme der DC-Platten angefertigt wurden, erfolgte die Quantifizierung der einzelnen Produktbanden durch einen ¹⁴C-Detektor (Berthold, "Tracemaster 20"). Dazu wurde für den Bereich der Produktbande das Integral der detektierten Zerfälle pro Stunde mit der zu Gerät gehörigen Software bestimmt. Zur Quantifizierung der detektierten Stoffmenge wurde der ¹⁴C-Detektor mit dem eingesetzten U-¹⁴C-Valin geeicht, es resultierte die in Abb. 3.5.3-1 wiedergegeben Eichkurve.



Abb. 3.5.3-1: Eichkurve für den ¹⁴C-Detektor. Durch entsprechende Verdünnung der U-¹⁴C-Valin-Stammlösung (260 mCi/mmol, 100 µCi/ml) wurden Proben erstellt, die 1 pmol, 3 pmol, 6 pmol, 10 pmol und 15 pmol radioaktiven Valins enthielten. Die Proben wurden in 70 µl MeOH aufgenommen, auf eine DC-Platte aufgebracht (1,5 cm Spurbreite), die DC wurde im Aminosäurelaufmittel entwickelt. Pro Spur wurde erwartungsgemäß nur eine markierte Bande identifiziert, diese wurde auf dem ¹⁴C-Detektor vermessen, die Signale wurden analog zur Quantifizierung der Produktbanden mit der zum Gerät gehörigen Software integriert.
4. Ergebnisse

4.1 Rekombinante Derivate der Actinomycinsynthetasen mit fusionierten Thioesterasedomänen

Hauptziel dieser Arbeit war es, funktional aktive Neukombinationen von NRPS-Modulen damit Struktur-Aktivitätsbeziehungen ΖU erzeugen, υm in den Peptidsynthetasen aufzuklären. Um dies in effektiver und auch in Hinblick auf die Generierung neuer Substanzen anwendungsreifer Weise zu realisieren, sollten monocistronische Konstrukte hergestellt werden, die für rekombinante Peptidsynthetasen (mit bis zu drei Modulen) kodieren. Durch das Einfügen geeigneter Restriktionsschnittstellen sollten Sequenzbereiche, kodierend für neue Module oder Domänen, eingebracht werden können, um veränderte oder neue Modellsysteme zu erzeugen.

Um eine möglichst hohe Expression der NRPS-Genkonstrukte zu erreichen, sollten diese von einem in hoher Kopienzahl vorliegenden Plasmid in *S. lividans* heterolog exprimiert werden, wie dies bereits zuvor für das *acmB*-Gen gezeigt worden war (Schauwecker *et al.*, 1998).

Um aus der ACMSII und dem Initiationsmodul, welches aus der ACMSI als alleinstehender A-Domäne und dem AcmACP als alleinstehender T-Domäne besteht (vergl. Abbildung 1.3-1), ein funktionsfähiges (*turn-over*-fähiges) Synthesesytem zu erstellen, wurde zunächst die ACMSII mit einer Freisetzungsfunktion (Te-Domäne) versehen. Hierfür wurde die Epimerasedomäne des D-Valin-Moduls der ACMSII entfernt und durch Thioesterasedomänen aus verschiedenen Organismen ersetzt. Für die optimale Wahl des Fusionspunktes wurden Alignments von T-Domänen und den carboxyterminal benachbarten *linker*-Bereichen aus verschiedenen NRPS-Systemen durchgeführt. T-Domänen verschiedenster Herkunft weisen in einem Bereich bis etwa 33 Aminosäuren hinter dem konservierten Serin-Rest des 4'-PPant-Bindungsmotives eine hohe Ähnlichkeit zueinander auf (Abbildung 4.1.1). Der darauf folgende Sequenzabschnitt wurde auf Grund seiner höheren Variabilität schon dem *linker*-Bereich zwischen den Domänen zugerechnet. Es wurde daher beschlossen, den Fusionspunkt direkt hinter dem Ende dieses konservierten Bereiches zu wählen, also 34 AS hinter dem Serin-Rest des 4'-PPant-Bindungsmotives.

	H2	
ACMSII_T1 :	DDFFELGGH <mark>SL</mark> LATRLIAHLRTVLG-	-VELELRSLFEGPTPAAVAARLDTAGPGRL
ACMSII_T2 :	EDFFALGGDSIVSIRLVSLARSA-G-	-IGFSVRDVFEQRTAAGLAVVAEELTASD
ACMSIII_T1 :	DDFF <mark>ELG</mark> GH <mark>SL</mark> LATRLIARIRAAFS-	-VELGLRTLFEARTAAAVAAHLDLAGPART
ACMSIII_T2 :	DDFF <mark>ELG</mark> GH <mark>SL</mark> LATRLIAQIRALFG-	-VELELRSLFEGPTPAAVAARLDTAGPGRL
ACMSIII_T3 :	QDFFDLGGHSLLATRLIARLRAAFG-	-VELGLRSLFEAPTPGGIAARLDLDDPD-GSYEV
BacA_T1 :	DHFAQMGGH <mark>SL</mark> HAMELIAKIKEKMN-	-VEIPLHQLFKLATIKELSAFIEANHQEDKGD
BacA_T2 :	VSYYEIGGDSLKAISIITEINKRMN-	-VEMPISEIFKNDTIIALDHYLKNREESDMEH
BacA_T3 :	SHFFEAGGHSLKAAALVSTIHKELN-	-VKLPLRQIFETPTIKGLRDISVRRRK-CFYI
BacA_T4 :	HHFFAAGGDSIKALQIVSRLAKM-N-	-LKLEMKALFANPKIKDLSRFITEETRHRKHN
BacB_T1 :	DHFFDIGGH <mark>SL</mark> KAFSMAAKIQSALK-	-VEVTLKEIFNHSTIQDLAAYIAQKQK-QVQS
BacB_T2 :	DNFFEIGGD <mark>SI</mark> KALQIVSKLSRA-D-	-LKLQVKDLFTNPFIRHLSKYVKKETKARTS-
BacC_T1 :	DHFFEMGGH <mark>SL</mark> KAAAMAARIRKELK-	-AEIPLGQIFKTPTIKGLGEYIRSTKD-SVYS
BacC_T2 :	HHFFAAGGDSIKALQIVSRLSRL-G-	-LKLEMKDLFANPRIKDLAKYVKKQSQRKNAN
BacC_T3 :	HNFFELGGH <mark>SL</mark> KAAALTAKLHKEMK-	-IEVPLRQLFETPTIKDIGDFIESMKE-SPYA
BacC_T4 :	HHFFAAGGDSIKALQMISRLSRE-G-	-LSLEMKDLFANPQIKSLSRYVKAESDKSASY
BacC_T5 :	ANIFDIGANSLNVMSFVSRLYAELG-	-FRVPFKDIFSKPTIKELSDFLKHAQDLLKDYTD
CDA_PS1_T1 :	DGFFDLGGH <mark>SL</mark> LATRLISRIRATAG-	-AEVPIRRVFEAPTVAELAPALTDGGRARA
CDA PS1 T2 :	DSFFDLGGH <mark>SL</mark> LATRLAGRIRGTLG-	-VELSVRRLFETPTVAGLSAALDGAERSGT
CDA PS1 T3 :	DGFFDLGGD <mark>SI</mark> LSIQLVARARAA-G-	-LVLSVRDVFEHQTPALLARSAAAAPAGD
CDA_PS1_T4 :	DNFFDLGGH <mark>SL</mark> LATRLVSRTRTALG-	-VELSIRQLFETPTVAGLAEALDASGTVRT
CDA PS1 T5 :	DNFF <mark>DLGGH<mark>SL</mark>LATRLVSRARTALG-</mark>	-VELSVRQFFETPTIAGLSGAFDRAGRARA
CDA_PS1_T6 :	DGFFDLGGD <mark>SI</mark> LSIQLVSRARAA-G-	-LALAVRDVFEHQSTARLAAALTDRDDAA
CDA PS2 T1 :	DSFFDLGGH <mark>SL</mark> LATRLVSRIRTTLG-	-RELPIRQLFETPTVAGLSRALDTSGTLRT
CDA PS2 T2 :	DGFFDLGGH <mark>SL</mark> LATRLVSRIRTALG-	-VELSVRQFFETPTIAGLSGALDRAAGARA
CDA_PS2_T3 :	DGFFDLGGD <mark>SI</mark> LSIQLVSRARAK-G-	-LTLSVRDVFEHQSVARVAEALELAEAQAAD
CDA_PS3_T1 :	DDFFDLGGH <mark>SL</mark> LATRLVSRVRTTLG-	-AELSIRQFFEAPTPAALAVVLAGAGRARA
CDA PS3 T2 :	DGFFDLGGH <mark>SL</mark> LAIRLVERVRAELG-	-EELGVRDLFAAPTVADLAVRLAARGGR-EPMER
Grs2_T1 :	DNFFSLGGH <mark>SL</mark> KAITLISRMNKECN-	-VDIPLRLLFEAPTIQEISNYINGAK-KESYV
Grs2_T2 :	DNFF <mark>ELG</mark> GH <mark>SL</mark> RAMTMISQVHKEFD-	-VELPLKVLFETPTISALAQYIADGE-KGMYL
Grs2_T3 :	DDFFTIGGH <mark>SL</mark> KAMAVISQVHKECQ-	-TEVPLRVLFETPTIQGLAKYIEETD-TEQYM
Grs2_T4 :	DNFFELGGH <mark>SL</mark> KATLLVAKIYEYMQ-	-IEMPLNVVFKHSTIMKIAEYITHQESENNVHQP
LicB_T1 :	DNFFSIGGH <mark>SL</mark> KAMMLTAKIQEQLQ-	-KEVPIKVLFEKPTIRELAEFLQG-ETKEKTA
LicB_T2 :	DNFFDLGGH <mark>SL</mark> KGMMLIAEIQSRLG-	-KKVPLKTLFDFPTAGLLARSIEASEGQSQQS
LicB_T3 :	DNFFALGGD <mark>SI</mark> KGIQMASRLQQY-G-	-WKLEMKDLFQHPTIGEISSYIEWADAKPINQ
SrfAA_T3 :	DNFFSLGGD <mark>SI</mark> KGIQMASRLNQH-G-	-WKLEMKDLNQHPTIEELTQYVERAEGKQADQ
SrfAB_T1 :	DNFFMIGGH <mark>SL</mark> KAMMMTAKIQEHFH-	-KEVPIKVLFEKPTIQELALYLEENESKEEQTFE
SrfAB_T2 :	DNFFDLGGH <mark>SL</mark> KGMMLIANIQAELE-	-KSVPLKALFEQPTVRQLAAYMEASAVSGGHQ
SrfAB_T3 :	DNFFSLGGDSIKGIQMASRLNQH-G-	-WKLEMKDLFQHPTIEELTQYVERAEGKQADQ
SrfAC_T1 :	DDFFALGGHSLKAMTAVP-HQQELG-	-IDLPVKLLFEAPTIAGISAYLKNGGSDGLQD-V
TycA_T1 :	DNFYSLGGDSIQAIQVVARLHSY-Q-	-LKLETKDLLNYPTIEQVALFVKST-TRKSDQ
TycB_T1 :	DHFFTLGGHSLKAIQLISRIQKECQ-	-ADVPLRVLFEQPTIQALAAYVEGGE-ESAYL
TycB_T2 :	DHFFELGGHSLKAMTVVAQVHREFQ-	-IDLLLKQFFAAPTIRDLARLIEHSE-QAAGA
ТусВ_ТЗ :	DNFFELGGDSIKAIQVSTRLNAS-G-	-WTLAMKELFQYPTIEEAALRVIPN-SRESEQ
TycC_T1 :	DDFFDLGGHSLKAMTVVFQVSKALE-	-VELPVKALFEHPTVAELARFLSRSE-KTEYT
TycC_T2 :	DHFFELGGHSLKAMHVISLLQRSFQ-	-VDVPLKVLFESPTIAGLAPLVAAAR-KGTYT
ТусС_ТЗ :	DNFFQIGGH <mark>SL</mark> KAMAVAAQVHREYQ-	-VELPLKVLFAQPTIKALAQYVATSG-KETYV
TycC_T4 :	DNFFEIGGH <mark>SL</mark> KAMNVITQVHKTFQ-	-VELPLKALFATPTIHELAAHIAESA-FEQFE
ТусС_Т5 :	DDFFALGCHSIRAMRVLSSMHNEYQ-	-VDIPIRILFEKPTIQELAAFIEETA-KGNVF
ТусС_Т6 :	DQFFELGCHSIKATLIIAKVYEYMQ-	-IEIPINLIEQYPTIEKVADFITHKRFESRYGTA
	Î	"EF"
	4 '-PPant-Bindungsstelle	Fusionspunkt

Abbildung 4.1-1: Auszug aus einem Alignment des Überganges von Thiolierungsdomänen zur jeweils nachfolgenden Domäne (Epimerase-, Kondensations- oder Thioesterasedomäne). Der Auszug umfasst die 4'-Phosphopanthetein-Bindungsstelle der Thiolierungsdomäne sowie die nachfolgenden etwa 50 Aminosäuren. Der zur Konstruktion von Hybrid-NRPS gewählte Fusionspunkt ist markiert (bezeichnet mit "EF" für die durch die EcoRI-Erkennungssequenz kodierte AS-Sequenz). Über dem Alignment sind die AS-Bereiche markiert, die den bei der Strukturaufklärung von TycC_T3 (Weber et al., 2001) gefundenen Helices 2 bis 4 entsprechen. Die Namen der Peptidsynthetasen und die jeweiligen Datenbankreferenzen sind in Abschnitt 2.12 aufgeschlüsselt. Der dem Enzymnamen folgende Index gibt an, zu welcher T-Domäne des jeweiligen Enzyms die gezeigte 4'-Phosphopanthetein-Bindungsstelle gehört.

_

Zur Erzeugung der geplanten hybriden Konstrukte durch Genfusion musste eine künstliche Restriktionsschnittstelle in den für den putativen flexiblen *linker*-Bereich kodierenden DNA-Abschnitt eingeführt werden. Das Restriktionsenzym *E*coRI hat eine Hexanucleotid-Erkennungssequenz (5'-**GAA TTC**-3'), die, wenn sie genau zwei Codons eines Leserahmens bildet, für die Aminosäuresequenz "EF" kodiert. Ein Vergleich von Sequenzen in Abb. 4.1-1 zeigt, dass in einer Reihe von NRPS-Modulen in dem gewählten Fusionspunkt Sequenzen auftreten, die den Konsens "sauer/aromatisch" haben. Die durch *E*coRI kodierte Sequenz "EF" harmoniert mit diesem Konsenus. Da außerdem die Erkennungssequenz von *E*coRI in *Streptomyces*-DNA relativ selten auftritt, wurde beschlossen, die geplanten Fusionen unter Einführung von künstlichen *E*coRI-Schnittstellen durchzuführen.

Der Fusionspunkt, der durch das Einbringen einer *E*coRI-Erkennungssequenz in die im Alignment (Abb. 4.1.1-1) markierte Position (Codons 34 und 35 hinter dem Codon des konservierten Serin-Restes des 4'-PPant-Bindungsmotives) resultiert, wird im Folgenden als *E*coRI-Fusionspunkt bezeichnet.

4.1.1 Konstruktion und Testung von ACM46 zur Validierung des gewählten EcoRI-Fusionspunktes

Um zu testen, ob die Einbringung des EcoRI-Fusionspunktes hinter die T-Domäne des 2. Moduls der ACMSII einen negativen Einfluss auf die katalytische Aktivität der Synthetase hat, wurde durch PCR-Mutagenese eine EcoRI-Schnittstelle hinter dem Codon für Ala²⁰⁹⁵ eingeführt (vgl. Abschnitt 3.2.2). Das so erzeugte Derivat des *acmB*-Gens (*acm46*) wurde in Plasmid pSPIJ005 kloniert und in *S. lividans* heterolog exprimiert. Das Protein ACM46 wurde durch fraktionierte Ammoniumsulfatfällung, Gelfiltration an UltroGel AcA34 und Ionenaustauschchromatographie an Q-Sepharose FF partiell gereinigt. Dabei wurden aus etwa 10 g Zellen 175 pmol Synthetase erhalten (entsprechend 50 µg Synthetase aus 1 | Kultur).

Die Testung des Enzyms ergab, dass es ATP-abhängig kovalent mit Threonin und Valin beladen wurde. Die Analyse der thioestergebundenen Zwischenstufen zeigte die Bildung von (L)-Thr-(L)-Val und (L)-Thr-(D)-Val auf dem Enzym, so dass zumindest qualitativ kein Unterschied zu ACMSII festgestellt werden konnte (siehe Abb. 4.1.1-1).



Abbildung 4.1.1-1: Bildung von Threonyl-(D,L)-Valin durch ACMSII (links) und ACM46 (rechts). Die Domänenanordnungen der Synthetasen und die enzymgebundenen Intermediate sind schematisch dargestellt. Der EcoRI-Fusionspunkt in ACM46 ist eingezeichnet, zum Vergleich ist die Wildtyp-Sequenz von *acmB*/ACMSII an der entsprechenden Position angegeben. Mittig ein Autoradiogramm der dünnschichtchromatographischen Auftrennung der Syntheseprodukte der ACMSII und von ACM46 (label = ¹⁴C-(L)-Valin).

Die Inkubation von ACM46 mit ACMSI und AcmACP in Gegenwart von Thr, Val, ATP, Mg²⁺ und p-Toluylsäure, einem Strukturanalogon von 4-MHA, (zur Markierung der Reaktionsprodukte wurde ¹⁴C-Valin eingesetzt) resultierte in der Bildung von p-Toluyl-Thr-D(L)-Val als enzymgebundenem Intermediat (siehe Abb. 4.2.1-2). Eine Freisetzung des Produktes war - im Einklang mit der Abwesenheit einer Te-Domäne in ACM46 - nicht zu beobachten. Die Bildung von enzymgebundenem Produkt war nach etwa 40 min Inkubation abgeschlossen. Die Menge des gebildeten Peptides erreichte dabei nur ca. 25% der Menge der Beladung, die mit Valin alleine erzielt wurde. Dies steht im Übereinklang mit Ergebnissen von A. Stindl (Diss. Stindl, 1993), die an ACMSII neben den kovalent gebundenen Zwischenstufen auch immer unumgesetztes Val bzw. Thr fand. Ebenso wurde bei der Untersuchung der Epimerase-Aktivität (Abb. 4.1.1-1) eine signifikante Menge unumgesetztes Valin an ACM46 nachgewiesen. Man kann daraus schließen, dass unter *non-turnover*-Bedingungen keine vollständigen Acylierungen erreicht werden.



Abbildung 4.1.1-2: Zellfreie Synthese von p-Toluyl-Threonyl-Valin durch ACMSI, AcmACP und ACM46. Links: Schematische Darstellung der Reaktion. Die Intermediate und das Reaktionsprodukt sind über den Synthetasen dargestellt. Zwei Ausschnitte aus den Autoradiogrammen der Extrakte sind eingefügt. (R: Steighöhe von authentischem p-Toluyl-Thr-Val). Rechts: Quantifizierung der Produktbildung. Die Quantifizierung der Produktbanden erfolgte durch Einsatz eines DC-Scanners (siehe Abschnitt 3.4.3).

4.1.2 Konstruktion und Testung von ACM47

Da die Einführung des EcoRI-Fusionspunktes in die Positionen 2096 und 2097 der ACMSII prinzipiell keine Veränderung der katalytischen Funktionen der ACMSII bewirkt hatte, konnte nun *acm*46 für verschiedene Domänenaustausche verwendet werden. Hierzu wurde zunächst der Thioesterasedomänen-kodierende 3'-ständige Abschnitt des *acm*C-Gens durch PCR unter Einführung einer EcoRI-Schnittstelle am 5'-Ende amplifiziert. Das PCR-Fragment wurde in pTZ18 kloniert und sequenziert. Anschließend wurde es unter Verwendung der EcoRI-Fusionsschnittstelle gegen das für die Epimerasedomäne von ACM46 kodierende 3'-Ende des *acm*46-Gens ausgetauscht (Abbildung 4.1.2-1). Das resultierende rekombinante NRPS-Gen *acm*47 wurde analog zu *acm*46 in *S. lividans* TK64 exprimiert. Die Aufreinigung von ACM47 erfolgte wie bei ACM46 durch Ammoniumsulfatfällung, Gelfiltration und Anionenaustauscherchromatographie (ein SDS-Page für ACM47 und Folgekonstrukte wird in Abschnitt 4.1.9 gezeigt).



Abbildung 4.1.2-1: Konstruktion von ACM47. Gezeigt ist **(A)** die schematische Herleitung für ACM47 von ACMSII und ACMSIII und **(B)** ein Auszug aus einem Alignment vom ACMSII, ACMSIII und ACM47. Der Auszug zeigt den T-E-Übergang im 2. Modul von ACMSII, den T-Te-Übergang im 3. Modul von ACMSIII und den T-Te-Übergang im 2. Modul von ACM47. Die Aminosäuresequenz am EcoRI-Fusionspunkt von ACM47 ist rot unterlegt.

Die Testung des gereinigten Enzyms zeigte, dass ACM47 kovalent gebundene Zwischenprodukte bildete (siehe Abb. 4.1.2-2). Jedoch konnte entgegen der Erwartung unter Standardbedingungen keine Freisetzung des Peptides durch die anfusionierte Thioesterasedomäne festgestellt werden. Auch war nach Veränderung der Inkubationsbedingungen (insbes. pH, mit und ohne den Serin-Proteinaseinhibitor Phenylmethylsulfonylfluorid) keine Freisetzung von Produkt festzustellen, was darauf hinweist, dass die Te-Domäne der ACMSIII in diesem Konstrukt nicht funktionell ist.



Abbildung 4.1.2-2: Zellfreie Synthese von p-Toluyl-Threonyl-Valin durch ACMSI, AcmACP und ACM47. Links: Schematische Darstellung der Reaktion. Rechts: Quantifizierung der Produktbildung.

Da wie in Abb. 4.1.2-1 gezeigt der Bereich zwischen T- und E- bzw. Te-Domäne bei ACMSII (M2) und ACMSIII(M3) ähnlich ist, kann vermutet werden, dass das am EcoRI-Fusionspunkt in ACM47(M2) auftretende "EF" einen negativen Einfluss auf die Funktionsfähigkeit der Te-Domäne haben könnte, da an dieser Stelle in ACMSII ein "VV" und in ACMSIII ein "AR" auftritt (siehe Alignment in Abb. 4.1-1). Um zu testen, ob eine Te-Domäne aus einem anderen System nach Fusionierung an den EcoRI-Fusionspunkt Produktfreisetzung katalysieren würde, wurden im Folgenden Te-Domänen aus Bacillus sp. für Fusionskonstrukte verwendet.

4.1.3 Konstruktion und Testung von ACM48

Der nach dem in Abb. 4.1-1 gezeigten Alignment eingeengte kodierende Bereich der SrfA-C Thioesterasedomäne wurde durch PCR von genomischer DNA aus Bacillus subtilis OKB105 unter Einführen des EcoRI-Fusionspunktes amplifiziert. Das Fragment wurde in pTZ18 subkloniert und sequenziert. Der für die Epimerasedomäne kodierende Bereich von acm46 wurde unter Nutzung der EcoRI-Fusionsschnittstelle durch das srfA-C-Te-Fragment ausgetauscht (Abb. 4.1.3-1).



Abbildung 4.1.3-1: Konstruktion von ACM48. Gezeigt ist (A) die schematische Herleitung für ACM48 von ACMSII und SrfAC und (B) ein Auszug aus einem Alignment vom ACMSII, SrfAC und ACM48. Die Aminosäuresequenz am EcoRI-Fusionspunkt von ACM48 ist rot unterlegt.

Nach Expression des resultierenden rekombinanten NRPS-Gens *acm48* in *S. lividans* und Reinigung wurde das Enzym ACM48 auf Produktbildung und –freisetzung getestet. Wie im Fall von ACM46 und ACM47 konnte auch hier enzymgebundenes p-Toluyl-Thr-Val nachgewiesen werden (siehe Abb. 4.1.3-2). Eine Produktfreisetzung vom Enzym war jedoch nicht nachweisbar. Auch hier könnte möglicherweise das am *EcoRI*-Fusionspunkt auftretende "EF" einen negativen Einfluss haben, da an dieser Stelle in SrfA-C die zu "EF" unähnliche Sequenz "AY" auftritt (Abb. 4.1-1).



Abbildung 4.1.3-2: Zellfreie Synthese von p-Toluyl-Threonyl-Valin durch ACMSI, AcmACP und ACM48. Links: Schematische Darstellung der Reaktion. Rechts: Quantifizierung der Produktbildung.

4.1.4 Konstruktion und Testung von ACM54

Da für die fusionierten Te-Domänen der Konstrukte ACM47 und ACM48 ein negativer Einfluss der nicht-konservativen Aminosäureaustausche am Fusionspunkt auf die Packung der Domänen nicht ausgeschlossen werden konnte, wurde nun anhand des in Abb. 4.1-1 gezeigten Alignments eine Te-Domäne gesucht, die am Fusionspunkt eine zu der durch die EcoRI-Fusionsschnittstelle kodierten Sequenz EF ähnliche Aminosäuresequenz aufweisen sollte. Im Übergangsbereich zwischen der letzten T-Domäne und der Te-Domäne der Tyrocidinsynthetase TycC wird an der Position des Fusionspunktes die zu EF ähnliche Sequenz DF gefunden, daher wurde beschlossen, die Te-Domäne von TycC unter Verwendung des EcoRI-Fusionspunktes in ein zu ACM47 und ACM48 analoges Konstrukt einzubringen.

Der für die Te-Domäne der Tyrocidinsynthetase 3 kodierende Bereich des tycC-Gens (abgeleitet anhand des Alignments in Abb. 4.1-1) wurde durch PCR an genomischer DNA von Bacillus brevis ATCC 8185 unter Einführen der 5'-ständigen EcoRI-Fusionsschnittstelle amplifiziert. Das resultierende Genfragment wurde in pTZ18 kloniert und sequenziert. Der für die Epimerasedomäne kodierende Bereich von acm46 wurde unter Nutzung der EcoRI-Fusionsschnittstelle durch das für die Tyc-Te kodierende Fragment ausgetauscht. Das nach heterologer Expression von acm54 und partieller Reinigung resultierende Enzym AMC54 wurde auf Produktbildung und freisetzung getestet. Im Falle dieses Enzyms konnte nicht nur die Bildung von enzymgebundenem p-Toluyl-Threonyl-Valin, sondern jetzt auch dessen Freisetzung nachgewiesen werden. Wie in Abbildung 4.1.4-1 zu sehen ist, steigt die Menge des freigesetzten Produktes über 90 min linear an, während die Menge des enzymgebundenen Produktes annähernd gleich und geringer als diejenige des freien Produkts bleibt. Nach 90 min Inkubation fand man viermal mehr freigesetztes als enzymgebundenes Produkt. Aufgrund des in der Abbildung 4.1.4-1 gezeigten zeitlichen Verlaufes der Bildung freigesetzten und enzymgebundenen Produktes wird davon ausgegangen, dass die Thioesterasedomäne von ACM54 am Valin-Modul auflaufendes Aryl-Dipeptid freisetzt und somit für turnover sorgt. Diese Daten zeigen, dass der EcoRI-Fusionspunkt prinzipiell geeignet ist, Thioesterasedomänen an die Thiolierungsdomäne des D-Valin-Moduls der ACMSII zu fusionieren. Diese Thiolierungsdomäne ist, wie im Konstrukt ACM54 für den Fall der Te-Domäne der Tyrocidinsynthetase III gezeigt werden konnte, in der Lage, mit Te-Domänen in konstruktive Wechselwirkung zu treten. Weshalb in den beiden Te-Testkonstrukten ACM47 und ACM48 die fusionierten Thioesterasedomänen (ACM-Te und Srf-Te) nicht aktiv waren, blieb zunächst ungeklärt. Bemerkenswert ist jedoch, dass von den drei in den Konstrukten ACM47, ACM48 und ACM54 untersuchten Te-Domänen nur diejenige funktionell aktiv war, die im Wildtypenzym an der dem Fusionspunkt entsprechenden Position eine Aminosäuresequenz aufweist, die dem durch die EcoRI-Fusionsschnittstelle kodierten Consensus "sauer/aromatisch" entspricht.



Abbildung 4.1.4-1: Konstruktion und Testung von ACM54. (A) Schematische Herleitung für ACM54 von ACMSII und TycC. (B) Auszug aus einem Alignment vom ACMSII, SrfAC und TycC. Die Aminosäuresequenz am EcoRI-Fusionspunkt von ACM48 ist rot unterlegt. (C) Zellfreie Synthese von p-ToluyI-ThreonyI-Valin durch ACMSI, AcmACP und ACM54. Oben: Quantifizierung der Produktbildung. Unten: Schematische Darstellungen der Reaktionen an ACM54 und ACM46, jeweils mit Ausschnitten aus den Autoradiogrammen der Extrakte. Die Banden repräsentieren jeweils enzymgebundenes und freigesetztes Produkt nach 90 min Inkubation.

4.1.5 Testung von ACM44

Der Befund, dass die Te-Domäne der Tyrocidinsynthetase III, jedoch nicht die Thioesterasedomäne der ACMSIII oder von SrfA-C, Aroyldipeptide von rekombinanten Derivaten der ACMSII freisetzte, war schwer verständlich, vor allem, da die Thioesterasedomäne der ACMSIII aus dem homologen ACM-System stammt, während die Tyc-Te aus einem bacillären, d.h. heterologen NRPS-System isoliert wurde.

Zur weiteren Untersuchung dieser beider Te-Domänen auf ihre Befähigung zur Produktfreisetzung von rekombinanten Derivaten der Actinomycin-Synthetasen wurde das früher hergestellte Konstrukt ACM44 herangezogen. ACM44 ist eine Fusion aus ACMSII (C1A1T1C2) und ACMSIII A3M3T3 (siehe Abb. 4.1.5-1).

Die Fusionierung von Teilen des *acmB*- und des *acmC*-Genes zu *acm44* war unter Nutzung einer natürlichen *Clal*-Schnittstelle an bp 4520 des *acmB*-Gens erfolgt. Die durch die Hexanucleotid-Erkennungssequenz von *Clal* kodierte AS-Sequenz "ID" steht auch im dritten Modul der ACMSIII an gleicher Stelle, so dass sich diese Fusionsschnittstelle stumm in das *acmC*-Gen einführen ließ.



Abbildung 4.1.5-1: Konstruktion von ACM44. (A) Schematische Herleitung für ACM44 von ACMSII und ACMSIII. Die Position des Fusionspunktes ist eingezeichnet. (B) Alignment von ACMSII, ACMSIII und ACM44 im Bereich des Clal-Fusionspunktes. In der Sequenz von ACM44 sind die durch die Clal-Fusionsschnittstelle kodierten Positionen ("ID") rot unterlegt.

ACM44 diente als Gerüst für weitere ACMSII-ACMSIII-Hybridenzyme (ACM50, ACM55, ACM56, ACM53). Diese enthielten im Unterschied zu ACM44 aber eine Thioesterasedomäne oder ein fusioniertes Initiationsmodul. Die Reinigung und

Testung von ACM44 zeigte erwartungsgemäß die Bildung von enzymgebundenem Aroyl-Dipeptid, aber keine Freisetzung desselben (Abb. 4.1.5-2).



Abbildung 4.1.5-2: Zellfreie Synthese von p-Toluyl-Thr-Val durch ACMSI, AcmACP und ACM44. Links: Schematische Darstellung der Reaktion. Zwei Ausschnitte aus den Autoradiogrammen der Extrakte sind eingefügt (a: Steighöhe von authentischem p-Toluyl-Thr-Val). Rechts: Quantifizierung der Produktbildung.

4.1.6 Konstruktion und Testung von ACM50

Die Existenz einer singulären natürlichen Clal-Schnittstelle an bp 4520 des acmB-Gens (entsprechend einer abgeleiteten Position am Ende der Kondensationsdomäne des Valin-Moduls) wurde ausgenutzt, um die Fusion mit dem gesamten unveränderten AMTTe-kodierenden Bereich des acmC-Gens (ab einer durch PCR-Mutagenese eingeführten Clal-Schnittstelle an bp 8911 dieses Gens) vorzunehmen (Abb. 4.1.6-1).



Abbildung 4.1.6-1: Konstruktion von ACM50. (A) Schematische Herleitung für ACM50 von ACMSII und ACMSIII. **(B)** Aminosäuresequenz im Übergangsbereich zwischen T- und Te-Domäne in ACMSIII und ACM50 (in diesem Bereich befindet sich bei ACM50 im Gegensatz zu allen anderen in diesem Paragraphen vorgestellten Konstrukten kein Fusionspunkt). Die Sequenz im Bereich des *Clal*-Fusionspunktes unterscheidet sich nicht von der im Fusionskonstrukt ACM44 vorgefundenen Sequenz (siehe Abb. 4.1.5-1).

Die Testung des nach Expression des kodierenden Gens in *S. lividans* erhaltenen Proteins ACM50 mit ACMSI und AcmACP in Gegenwart von Thr, Val, ATP und p-Toluylsäure ergab, dass das Enzym p-Toluyl-Thr-Val bildete und freisetzte. Dies zeigt an, dass die Te-Domäne der ACMSIII in rekombinanten Enzymen Produkte abspaltet, wenn sie im natürlichen Verbund mit ACMSIII-T₃ steht.



Abbildung 4.1.6-2: Zellfreie Synthese von p-Toluyl-Threonyl-Valin durch ACMSI, AcmACP und ACM50. Links: schematische Darstellung der Reaktion. Rechts: Quantifizierung der Produktbildung.

ACM50 besitzt im Unterschied zu ACM54 eine zusätzliche M-Domäne. Um zu untersuchen, ob diese M-Domäne in ACM50 funktionsfähig ist, wurde das Enzym nicht nur mit p-Toluylsäure, Thr, Val und ATP, sondern auch unter Zusatz von AdoMet inkubiert. Diese Tests zeigten Bildung und Freisetzung einer zusätzlichen Verbindung neben p-Toluyl-Thr-Val (Abb. 4.1.6-3). Diese Verbindung wies einen R_f-Wert auf, der höher als der von p-Toluyl-Thr-Val und immer mit demjenigen von p-Toluyl-Thr-N-MeVal identisch war. Dieses Produkt trat in Abwesenheit von AdoMet nicht auf, jedoch katalysierte das Enzym auch in Anwesenheit von AdoMet die Bildung von p-Toluyl-Thr-Val als Hauptprodukt. Daher wurden weitere Analysen in der Regel in Abwesenheit von AdoMet durchgeführt.



Abbildung 4.1.6-2: Autoradiogramme der dünnschichtchromatographischen Auftrennung der Extrakte bei Inkubation von ACMSI, AcmACP und ACM50 in Gegenwart (links) und Abwesenheit (rechts) von AdoMet. (a = p-Toluyl-Threonyl-Valin, b = p-Toluyl-Threonyl-N-Methyl-Valin).

4.1.7 Konstruktion und Testung von ACM55

ACM50 hat eine Te-Domäne (aus der ACMSIII), welche die Freisetzung von Aroyl-Dipeptid katalysiert. Im Konstrukt ACM47 dagegen, in dem dieselbe Te-Domäne unter Verwendung des EcoRI-Fusionspunktes hinter die zweite T-Domäne der ACMSII fusioniert worden war, ist diese Te-Domäne nicht aktiv. Um den Einfluss des EcoRI-Fusionspunktes (EF) auf das Vermögen der Te-Domäne der ACMSIII zur Produktabspaltung zu analysieren, wurde die gleiche EcoRI-Fusionsschnittstelle durch PCR-Mutagenese in *acm50* eingeführt (Abb. 4.1.7-1).



ACMSIII_M3 : DFFDLGGHSLLATRLIARLRAAFGVELGLRSLFEAPTPGGIAARLDLDDPDGSYEVVLPL ACM55_M2 : DFFDLGGHSLLATRLIARLRAAFGVELGLRSLFEAPTPGGIA<mark>EF</mark>LDLDDPDGSYEVVLPL

Abbildung 4.1.7-1: Konstruktion von ACM55. (A) Schematische Herleitung für ACM55 von ACMSII und ACMSIII. (B) Alignment von ACMSIII und ACM55 im Bereich des EcoRI-Fusionspunktes.

Das resultierende Gen *acm55* wurde in *S. lividans* exprimiert und das Genprodukt ACM55 gereinigt. Die Testung des Enzyms ergab, dass ACM55 zwar die Bildung von enzymgebundenem Aryl-Thr-Val katalysierte, jedoch das Produkt nicht freisetzte (Abb. 4.1.7-2). Dieses Resultat zeigt klar, dass die durch den EcoRI-Fusionspunkt bewirkte Sequenzänderung im *linker* zwischen T- und Te-Domäne zum Verlust der katalytischen Aktivität der Te-Domäne aus der ACMSIII führt. Dies ist bemerkenswert, da im Konstrukt ACM54 die unter Verwendung dieses Fusionspunktes fusionierte Te-Domäne von TycC katalytisch aktiv war. Jedoch weist die TycTe in ihrem Wildtypmodul an der Position des EcoRI-Fusionspunkts ein DF auf. Dies zeigt, dass die Position des EcoRI-Fusionspunktes eher integral zur Te-Domäne als einem *linker*-Bereich angehört.



Abbildung 4.1.6-2: Zellfreie Synthese von p-Toluyl-Threonyl-Valin durch ACMSI, AcmACP und ACM55. Links: Schematische Darstellung der Reaktion. Rechts: Quantifizierung der Produktbildung.

4.1.8 Konstruktion und Testung von ACM56

Um festzustellen, ob die Te-Domäne von TycC unter Verwendung des EcoRl-Fusionspunktes auch in Konstrukte mit Domänen aus dem N-Methyl-Valin-Modul der ACMSIII eingebracht werden kann und dabei ihre katalytische Aktivität behält, wurde der für die Tyc-Te kodierende Bereich aus *acm54* isoliert und hinter die EcoRl-Fusionsschnittstelle von *acm55* fusioniert, das resultierende rekombinante NRPS-Gen *acm56* wurde in *S. lividans* exprimiert und das Genprodukt nachgewiesen, gereinigt und getestet.



Abbildung 4.1.8-1: Konstruktion von ACM56. (A) Schematische Herleitung für ACM56 von ACM55 und TycC. **(B)** Alignment von ACMSIII, TycC und ACM56 im Bereich des EcoRI-Fusionspunktes.

Es wurde deutlich mehr enzymgebundenes als freies Produkt gefunden. Jedoch verlief die Produktfreisetzung signifikant, wenn man sie mit dem Verhalten der Enzyme ACM46 und ACM44 (Kontrollen ohne Te-Domäne) vergleicht (Abb. 4.1.6-2).

Dies zeigt wiederum, dass der gewählte Fusionspunkt der Struktur der Te-Domäne und nicht dem "variablen Bereich" angehört.



Abbildung 4.1.6-2: Zellfreie Synthese von p-Toluyl-Threonyl-Valin durch ACMSI, AcmACP und ACM56 Links: Schematische Darstellung der Reaktion. Rechts: Quantifizierung der Produktbildung.

4.1.9 Vergleichende quantitative Analyse der Synthetasen ACM46-56 und ihrer Produktbildungsraten

Die SDS-gelelektrophoretische Auftrennung der in den vorhergehenden Paragraphen beschriebenen Präparationen verschiedener rekombinanter Peptidsynthetasen ist in Abb. 4.1.9-1 gezeigt.



Abbildung 4.1.9-1: Expressionskonstrukte zur heterologen Expression der rekombinanten NRPS Gene acm46-53 und Präparationen der Peptidsynthetasen ACM46, ACM47, ACM48, ACM50, ACM53, ACM54, ACM55 und ACM56. (A) Aufbau des Expressionskonstruktes und allgemeines Schema der exprimierten Gene (herausgezeichnetes Insert). Der Vektorrumpf außerhalb des herausgezeichneten Insertbereiches war für alle Konstrukte identisch und leitet sich von pSPIJ005 ab (*bla*: Ampicillinresistenzgen, *tsr*: Thiostreptonresistenzgen, *rep pIJ101*: Replikationsgen, *mel*C2: Im Konstrukt verbliebener Anteil des mel-Operons von pIJ702). (B) Coomassie-gefärbtes 5% Proteingel der Proteinfraktionen nach Elution von Q-Sepharose.

Da die Proteinfraktionen naturgemäß nicht homogen waren, konnten die Gehalte an Synthetasen nicht über die Proteinkonzentrationen bestimmt werden. Bei der Testung der rekombinanten NRPS wurde immer dasselbe Volumen der jeweiligen Proteinpräparation eingesetzt. Ein Rückschluss auf die eingesetzte Menge an Synthetase ist über die in den Threonin- und Valin-Thioesterbindungs-Essays ermittelten Enzymaktivitäten möglich. In Tabelle 4.1.9-1 sind die anhand der Valin-Thioester-Bindungsassays quantifizierten Enzymkonzentrationen für die verschiedenen Proteinpräparationen aufgelistet.

Zur Quantifizierung der durch zellfreie Synthese erzeugten enzymgebundenen und freigesetzten Produkte wurde der zur Detektion der Produktbanden auf DC benutzte Scanner mit bekannten Mengen ¹⁴C-Valin geeicht (siehe Abschnitt 3.5.3). In Tabelle 4.1.9-1 sind die initialen Reaktionsgeschwindigkeiten für die Bildung von enzymgebundenem und freigesetzten Produkt für die in den vorangegangenen Paragraphen vorgestellten rekombinanten Peptidsynthetasen aufgeführt. Den Berechnungen der Initialgeschwindigkeiten ist die Menge der nach 20 min Inkubation gebildeten Produkte zugrunde gelegt.

Konstrukt	Domänenanordnung	Konzentration	$\mathbf{v}_{\texttt{init}}$	$\mathbf{v}_{\texttt{init}}$
		d. Synthetase	Freisetzung	Beladung
		[pmol/100 µl]	$[pmol l^{-1}s^{-1}]$	$[pmol l^{-1}s^{-1}]$
ACM44	$ACMSII(CA_{Thr}TC) - ACMSIII(A_{Val}MT)$	2,0	-	1,1
ACM46	$ACMSII(CA_{Thr}TCA_{val}T-E)$	0,8	-	0,67
ACM47	$ACMSII(CA_{Thr}TCA_{val}T) - ACMSIII(Te)$	0,9	-	0,26
ACM50	$ACMSII(CA_{Thr}TC) - ACMSIII(A_{Val}MTTe)$	0,6	2,8	0,40
ACM55	ACMSII(CA _{Thr} TC)-ACMSIII(A _{Val} MT-Te)	1,2	-	0,88
ACM54	$ACMSII(CA_{Thr}TCA_{val}T) - TycC(Te)$	6,8	2,7	1,1
ACM56	$ACMSII(CA_{Thr}TC) - ACMSIII(A_{Val}MT) -$	1,5	0,88	0,95
	TycC(Te)			
ACM48	$ACMSII(CA_{Thr}TCA_{Val}T) - SrfAC(Te)$	6,0	-	1,1

Tabelle 4.1.9-1: Quantifizierung der Enzymaktivität in den Präparationen der rekombinanten Peptidsynthetasen ACM44-56 und der initialen Produktbildungsgeschwindigkeiten.

Bei der Testung der Synthetasen wurde ¹⁴C-Valin eingesetzt, das in einer Konzentration von 6,9 μ M vorlag. Der k_M-Wert der Beladung mit Valin wurde für das D-Valin-Modul der ACMSII als 20 μ M bestimmt (Stindl, 1993), für das N-Methyl-Valin-Modul von ACM53 als 14 μ M (diese Arbeit, siehe Abschnitt 4.3.1). Die Testung der Konstrukte erfolgte also bezüglich Valin nicht unter Substrat-Sättigung. Bei den in

74

Tabelle 4.1.9-2 aufgeführten anfänglichen Produkt-Bildungsgeschwindigkeiten handelt es sich also nicht um v_{max} , daher kann anhand der initialen Reaktionsgeschwindigkeiten auch nicht direkt auf die Umsatzzahl k_{cat} geschlossen werden. Da jedoch die Substratkonzentration und die apparenten K_M-Werte für die getesteten Valin-Module bekannt ist, kann unter der Annahme, dass die Produktbildung an den rekombinanten Peptidsynthetasen ACM44-56 nach dem Michaelis-Menten-Formalismus beschrieben werden kann, nach

$$v_{max} = v + \frac{v K_{M}}{[S]}$$

auf v_{max} geschlossen werden. Die so berechneten Maximalgeschwindigkeiten v_{max} sind Tabelle 4.1.9-2 zu entnehmen, ebenso die aus v_{max} und den in Tabelle 4.1.9-1 angegebene Enzymkonzentrationen berechneten Umsatzzahlen k_{cat} .

Tabelle 4.1.9-2: Abgeleitete Maximalgeschwindigkeiten v_{max} und Umsatzzahlen k_{cat} an den rekombinanten Peptidsynthetasen ACM44-56

Konstrukt	Domänenanordnung	v_{max}	V _{max}	$\mathbf{k}_{\mathtt{cat}}$	$\mathbf{k}_{\mathtt{cat}}$
		Freisetzung	Beladung	Freisetzung	gebundenes
					Produkt
		[pmol l	. ⁻¹ s ⁻¹]	[mi]	n ⁻¹]
ACM44	$ACMSII(CA_{Thr}TC) - ACMSIII(A_{Val}MT)$	-	3,2		0,011
ACM46	$ACMSII(CA_{Thr}TCA_{val}T-E)$	-	2,6		0,023
ACM47	$ACMSII(CA_{Thr}TCA_{val}T) - ACMSIII(Te)$	-	1,0		0,0081
ACM50	$ACMSII(CA_{Thr}TC) - ACMSIII(A_{Val}MTTe)$	8,3	1,2	0,10	0,014
ACM55	$ACMSII(CA_{Thr}TC)-ACMSIII(A_{Val}MT-Te)$	-	2,6		0,016
ACM54	$ACMSII(CA_{Thr}TCA_{val}T) - TycC(Te)$	11	4,3	0,012	0,0048
ACM56	ACMSII (CA _{Thr} TC) - ACMSIII (A _{Val} MT) -	2,6	2,9	0,013	0,014
	TycC (Te)				
ACM48	ACMSII(CA _{Thr} TCA _{Val} T)-SrfAC(Te)	-	4,3		0,0051

Die höchste Umsatzzahl (Wechselzahl) wurde mit $k_{cat} = 0,1 \text{ min}^{-1}$ für die rekombinante Peptidsynthetase mit dem nativen Übergang zwischen T- und Te-Domäne (ACM50) berechnet. Ein Vergleich mit der Umsatzzahl, die bei der Synthese des 4-MHA-Pentapeptidlaktones an den Actinomycinsynthetasen erreicht wird, ist schwierig, da die *in vitro* Totalsynthese von Actinomycin durch die getrennt gereinigten Actinomycinsynthetasen noch nicht gezeigt werden konnte. Für die *in vitro*-Totalsynthese von Actinomycin in homogenisiertem Mycel von S. *chrysomallus* wurde unlängst eine Umsatzzahl von etwa 0,01 min⁻¹ abgeschätzt, während für die *in vivo* Actinomycinsynthese in S. *chryosmallus* angenommen wird, dass in etwa ein Produktmolekül pro Minute und Megasynthetase gebildet wird (pers. Mitteilung U. Keller).

4.2 Konstrukte mit integralen Initiationsmodulen

4.2.1 Ein Di-Domänen Initiationsmodul (ACMA1FUS002)

Das Loadermodul des Actinomycinsynthetasesystems der besteht aus alleinstehenden A-Domäne ACMSI und der alleinstehenden Carrier-(T)-Domäne AcmACP. Um die vorangegangenen Konstrukte mit integralen, d.h. fusionierten Initiationsmodulen testen zu können, wurden die Gene acmA (ACMSI) und acmD (AcmACP) untereinander fusioniert. Die Fusionierung wurde dabei direkt zwischen dem 3'-Ende von acmA (ausschließlich des Stopcodons) und dem 5'-Ende von acmD vorgenommen. Diese Art der Fusionierung erschien unbedenklich, da die Sequenz des fusionierten Bereiches sowohl in Bezug auf Domänenabstand (A zu T) als auch in der Konservierung bestimmter AS-Reste nicht dramatisch von den natürlichen A-T-Übergängen in verschiedenen Modulen des ACMS-Systems abweicht (siehe Abb. 4.2.1).



Abbildung 4.2.1: Alignment der A-T-Übergänge innerhalb der modularen Peptidsynthetasen des Actinomycinclusters mit dem durch Fusionierung von ACMSI und AcmACP entstandenen A-T-Übergang in der rekombinanten Peptidsynthetase ACMA1FUS002. Unter dem Alignment ist der Bereich von ACMA1FUS gekennzeichnet, der sich von ACMSI bzw. AcmACP herleitet. Durch die Fusionierung resultiert in der Aminosäuresequenz von ACMA1FUS eine Änderung gegenüber der Sequenz in AcmACP (M¹->G), die entsprechende AS-Position ist im Alignment rot unterlegt.

Für die Herstellung eines zusammengesetzten Initiationsmodules wurde mittels PCR das Stopcodon des *acm*A-Gens durch eine *Bam*HI-Schnittstelle ersetzt. Auf der anderen Seite wurde das Startcodon des *acm*D-Gens in eine *Bg*/II-Schnittstelle überführt. Nach einer *Bam*HI-*Bg*/II-Fusion erhielt man ein rekombinantes NRPS-Gen der Zusammensetzung *acm*A-*acm*D (*fusl_acp*), das in den Expressionsvektor pQE32 (Qiagen) kloniert wurde (pFUS*I_ACP32). Durch Umklonierung des Fragmentes als *Bg*/II-EcoRI-Fragment in pSPIJ004 entstand daraus pACMA1FUS002, mittels dessen *fus*I_acp* unter Kontrolle des mel-Promotors in *S. lividans* exprimiert werden konnte. Zur Testung des künstlichen Initiationsmodules wurde das in *S. lividans* exprimierte Protein mittels NiNTA-Chromatographie gereinigt und mit ACMSII in Gegenwart von Thr, Val und p-Toluylsäure umgesetzt. Als Kontrolle dienten ACMSII und freie ACMSI und AcmACP. Die Abb. 4.2-1 zeigt, dass das fusionierte Loadermodul den Einbau von p-Toluylsäure in Arylpetide katalysiert wie alleinstehende ACMSI und AcmACP.



Abbildung 4.2.1-1: Konstruktion und Testung ACMA1FUS002 (A) Schematische Ableitung der rekombinanten Peptidsynthetase ACMA1FUS002 von ACMSI und AcmACP. Der Fusionspunkt (*BamHI-Bg/II-Fusion*) ist eingezeichnet. (B) Expression von ACMA1FSU002 in *S. lividans* (SDS-PAGE und Western-Blot mit Hexa-His-Antikörper). (C) Produktbildung an der ACMSII unter Mitwirkung des natürlichen Initiationsmoduls aus ACMSI und AcmACP (links) und von ACMA1FUS002 (rechts) im zellfreien System. Die "perspektivische" Darstellung von ACMSI, AcmACP und ACMA1FUS002 wurde gewählt, um den Unterschied zwischen den beiden Reaktionsansätzen hervorzuheben.

4.2.2 Ein fusioniertes Initiationsmodul (ACM45)

Die erwiesene Funktionstüchtigkeit des Initiationsmodules A-T ließ erwarten, dass dessen Fusion an ACMSII oder ein davon abgeleitetes Derivat ein Enzym liefern sollte, das Aroyldipeptide synthetisieren kann. Zu diesem Zweck wurde das A-T-Gen aus pFUS als *SphI*-Fragment ausgeschnitten und in die *SphI*-Schnittstelle von *acm5* (*acmB*-Gen mit künstlicher *SphI*-Schnittstelle auf dem Translations-Startcodon, Schauwecker *et al.*, 1998) insertiert. Es resultierte das rekombinante NRPS-Gen *acm45*.

77

Ein Alignment zeigt, dass der durch die Fusionierung in ACM45 entstehende Modul-Modul-linker hinsichtlich seiner Länge nicht dramatisch von den natürlichen Modul-Modul-linkern in den Actinomycinsynthetasen II und III abweicht (Abb. 4.2.2-1).



Abbildung 4.2.2-1: Alignment der Modul-Modul-Übergänge zwischen dem fusionierten Loader-Modul (ACM45_M1) mit Modul-Modul-Übergängen in ACMSII und ACMSIII. Die durch die Fusionierung der kodierenden Gene erzeugten AS-Positionen "MH" sind rot unterlegt. Unter dem Alignment ist der Bereich von ACM45 gekennzeichnet, der sich vom AcmACP bzw. ACMSII herleitet.

ACM45 wurde nach heterologer Expression in *S. lividans* und partieller Reinigung auf die Bildung enzymgebundener Aroyl-Dipeptide untersucht (Abb. 4.2.2-2). Es konnte gezeigt werden, dass ACM45 ebenso zu Synthese von Aroyldipeptid befähigt war wie der Kontrollansatz aus ACMSI, AcmACP und ACMSII.



Abb. 4.2.2-2: Zellfreie Synthese von p-Toluyl-Thr-Val durch ACM45. Autoradiogramm der dünnschichtchromatographischen Auftrennung der am Enzym gebildeten Intermediate. Über dem Autoradiogramm die schematischen Darstellungen der Reaktionen.

4.3 Eine rekombinante Peptidsynthetase mit Befähigung zum Produktumsatz

4.3.1 Konstruktion und in vitro-Testung ACM53

Da die Fusionierung von ACMSI, AcmACP und ACMSII zu einer zur Initiation der Peptidsynthese befähigten funktionalen trimodularen Peptidsynthetase geführt hatte, wurde nun das erstmalig in ACM45 erprobte fusionierte Initiationsmodul an ACM50 fusioniert. Dadurch sollte eine rekombinante trimodulare Peptidsynthetase, welche die Funktionen sowohl zur Initiation als auch zur Termination der Peptidsythese auf einem Enzym vereinte, erhalten werden.

Hierzu wurde das A-T-Genkonstrukt in die Sphl-Schnittstelle auf dem Initiationscodon von *acm50* kloniert. Es resultierte ein ununterbrochener Leserahmen von AT und *acm50* mit einer Gesamtlänge von 10011 bp, der für die in Abb. 4.3.1-1 gezeigte trimodulare Peptidsynthetase (*acm53*) kodiert.

Expression von *acm53* in *S. lividans* unter Kontrolle des mel-Promotors lieferte ein Protein der erwarteten Größe (berechnet: 363 kDa). Die Reinigung und Testung erfolgte nach den oben beschriebenen Standardmethoden. Man erhielt 2,8 pmol Synthetase pro 100 µl Präparation. Die Testung zeigte, dass das Protein Aroyldipetid synthetisierte und freisetzte.



Abbildung 4.3.1-1: Konstruktion und *in vitro*-Testung ACM53 (A) Schematische Ableitung ACM53 von ACMA1FUS002 und ACM50. (B) Autoradiogramme der auf DC aufgetrennten Produkte der zellfreien Synthese (a = authentisches p-Toluyl-Thr-Val). (C) Zellfreie Synthese von p-Toluyl-Thr-Val durch ACM53. Schematische Darstellung der Reaktion (links) und Quantifizierung der Produktbanden auf DC (rechts).

Ausgehend von der anhand des Valyl-Enzym-Thioesters bestimmten Enzymkonzentration wurde abgeschätzt, dass im zellfreien System pro Synthetase 0,003 Produktmoleküle pro min gebildet wurden. Um die Umsatzzahl (k_{cat}) an ACM53 zu bestimmen, wurden Messungen mit höheren Gesamtkonzentrationen an Valin durchgeführt. Abbildung 4.3.1-2 zeigt die Auftragung der nach 30 min durch das Enzym freigesetzten Aktivität gegen die Valin-Konzentration.



Abbildung 4.3.1-2: Bestimmung der Geschwindigkeit der Produktbildung an ACM53 in Abhängigkeit von der Konzentration des Valins (14C-markierte Komponente) im in vitro-Assay. Es wurde die Produktbildung nach 30 min vermessen. Es wurden pro Aliquot 10 pmol Enzym eingesetzt, es wurden 2 μM, 5 mM, 10 μM, 40 μM und 90 μM ¹⁴C markiertes Valin [100 mCi/mmol] angeboten, die Konzentrationen der anderen Substrate wurde konstant gehalten. **(A)** Auftragung der Anfangsgeschwindigkeiten gegen die Valin-Konzentration. **(B)** Reziproke Auftragung (Lineweaver-Burk-Blot).

Nach Lineweaver und Burk können aus dieser reziproken Auftragung K_M sowie die maximale Reaktionsgeschwindigkeit v_{max} (und mittelbar k_{kat}) ermittelt werden. Anhand der oben gezeigten reziproken Auftragung wurde gefunden:

> $K_{M} = 14 \ \mu M$ $v_{max} = 7,7 \ pmol \ l^{-1} \ s^{-1}$ $k_{cat} = 0,03 \ min^{-1}$

Die hier gefundene Umsatzzahl k_{cat} liegt also in der Größenordnung, die für die bimodularen rekombinanten Peptidsynthetasen (vgl. Tabelle 4.1.9-2) berechnet wurden. Allerdings wurde für das zu ACM53 analoge System mit separiertem Initiationsmodul (ACM50 + ACMS I und AcmACP) eine Umsatzzahl von 0,1 min⁻¹ bestimmt. Der Befund, dass für das fusionierte System ACM53 eine Umsatzzahl festgestellt wurde, die nur etwa 1/3 der Umsatzzahl am nicht-fusionierten System beträgt, kann eventuell als Hinweis gedeutet werden, dass die Prozessivität an ACM53 durch die vorgenommenen Fusionierungen in Mitleidenschaft gezogen wurde.

4.3.2 In vivo – Testung von ACM53

Kurzzeitfütterungsexperimente mit Mycelium aus Flüssigkulturen von mit pACM53 transformierten *S. lividans* mit ¹⁴C-markiertem Threonin oder Valin sind in Abb. 4.3.2-1 gezeigt. Da *S. lividans* keine der Aryl-Carbonsäuren produziert, die als Substrate des Initiationsmodules der Actinomycinsynthetasen charakterisiert wurden (Keller und Schlumbohm, 1992), wurden diese Experimente in der zusätzlichen Anwesenheit von 1 mM p-Toluylsäure oder 4-MHB durchgeführt. Die Abbildung zeigt, dass in Anwesenheit von p-Toluylsäure oder 4-MHB jeweils zwei Verbindungen gebildet werden, die in Abwesenheit dieser Aryl-Carbonsäuren nicht nachzuweisen waren. Der Vergleich dieser Verbindungen mit synthetischen Standards ergab, dass es sich um p-Toluyl-Thr-Val und p-Toluyl-Thr-MeVal (bzw. analoge Verbindungen von 4-MHB) handelte. In Kontrollexperimenten mit Mycelium von *S. lividans* (transformiert mit pSPIJ004, ohne NRPS-kodierendes Insert) konnte die Bildung dieser Aryol-Dipeptide nicht festgestellt werden. Dies zeigt, dass die enzymatischen Funktionalitäten zur Bildung dieser Substanzen durch acm53 kodiert wurden.

Interessanterweise wurde in den Kurzzeitfütterungsexperimenten mit Mycelium von S. *lividans* (transformiert mit pACM53) auch die Bildung von p-Toluyl-Threonin bzw. 4-MHB-Threonin beobachtet, was entweder auf eine spontane oder enzymatische Freisetzung dieses Intermediates hinweist.

Die Tatsache, dass sowohl N-methyliertes als auch unmethyliertes Aroyl-Dipeptid gefunden wurden, ist bemerkenswert, da die C-Domäne aus dem D-Valin-Modul der ACMSII in ihrer natürlichen Funktion nur Valin kondensiert.



Abbildung 4.3.2-1: Autoradiogramm der DC-Auftrennung eines Extraktes von S. lividans/pACM53 nach 90 min Inkubation des Mycels mit ¹⁴C-markierten Aminosäuren. Die zugefütterten Aryl-Carbonsäuren sind unter dem Autoradiogramm als Strukturformeln dargestellt (von links: Kontrolle mit Wasser (-), 4-Methyl-Hydroxy-Benzoesäure und p-Toluylsäure. Die Pfeile zeigen die Laufhöhen der synthetischen Referenzen p-Toluyl-Thr-MeVal (a), p-Toluyl-Thr-Val (b) und p-Toluyl-Thr (c).

4.3.3 Expression von acm53 unter Kontrolle des acmA-Promotors

Das Ausmaß der Expression des rekombinanten NRPS-Gens acm53 im Plasmid pSPIJ005 ließ im Verlauf der weiteren Untersuchungen von ACM53 nach. Dies wurde auf eine Instabilität des mel-Promotors zurückgeführt. Daher wurde acm53 in einem während der Untersuchungen acm-Promotoren an den entwickelten Expressionsplasmid (plOacmA, siehe Paragraph 4.6.10) unter Kontrolle des natürlichen acmA-Promotors gestellt. Im Falle von acm53 resultierte das Expressionskonstrukt pIOACM53. Tatsächlich zeigten Testungen von Proteinextrakten von mit plOacm53 transformiertem S. lividans die Anwesenheit von ACM53 (ein SDS-PAGE mit Proteinextrakten von S. lividans (pIOACM53) wird in Abschnitt 4.6.10 gezeigt). Die Intensität der Proteinbande lag in allen Fällen sehr viel höher als bei Expression von acm53 unter Kontrolle des mel-Promotors. Aus diesem Grunde wurden alle Folgekonstrukte zur Expression unter Kontrolle des in einem späteren Teil dieser Arbeit (siehe Paragraph 4.6) analysierten acmA-Promotors gestellt.

4.3.4 Kurzzeit-Fütterungsexperimente unter Zusatz verschiedener Aryl-Carbonsäuren

Untersuchungen der Substratspezifität der ACMSI aus S. chrysomallus zeigten, dass dieses Enzym eine Reihe von der 4-MHA strukturverwandten Carbonsäuren aktivieren kann (Keller et al., 1984). Verschiedene dieser Carbonsäuren wurden für Einbauexperimente in S. chrysomallus verwendet und anstelle von 4-MHA in Pentapeptidlaktone (Analoge der Actinomycin-Halbmoleküle) eingebaut. Es war deshalb zu erwarten, dass alle diese Carbonsäuren bei Fütterung von mit pIOACM53 transformiertem S. lividans in entsprechendene Aroyldipeptide eingebaut werden sollten. Abb. 4.3.4-1 zeigt, dass z. B. neben p-Toluylsäure und 4-MHB auch 4-Hydroxy-Benzoesäure, 4-Ethylbenzoesäure, 4-MHA, 3-Hydroxyanthranilsäure und m-Toluylsäure in Verbindungen eingebaut werden, die als Analoga der entsprechenden mit p-Toluylsäure erhaltenen Verbindungen betrachtet werden können. Bei Zufütterung von Aryl-Carbonsäuren, die eine Aminophenolfunktion enthielten (3-HA, 4-MHA) treten mehr Produktbanden auf. Da bekannt ist, dass sich Phenoxazinone spontan aus Aminophenolen bilden, ist davon auszugehen, dass diese zusätzlichen Verbindungen durch Phenoxazinonbildung der 4-MHA- bzw. 3-HA-Dipeptide mit sich selbst bzw. 4-MHA respektive 3-HA entstanden sind.

82



Abbildung 4.3.4-1: *In-vivo-Produktbildung durch S. lividans / pIOACM53 nach Zufütterung verschiedener Aryl-Carbonsäuren.* Gezeigt ist ein Autoradiogramm der dünnschichtchromatographischen Auftrennung der organischen Extrakte aus den Fütterungsexperimenten. Angeboten wurden (Spuren 1-7) p-Toluylsäure (f.c. 1 mM), 4-MHB (f.c. 1 mM), 4-Hydroxy-Benzoesäure (f.c. 2mM), 4-Ethylbenzoesäure (f.c. 2 mM), 4-MHA (f.c. 0,5 mM), 3-Hydroxyanthranilsäure (f.c. 0,5 mM) und m-Toluylsäure (f.c. 2 mM). Als Radiomarkierung diente ¹⁴C-Threonin (1 μCi pro Ansatz). Zur Identifizierung der Produkte wurden synthetische Referenzen eingesetzt (a = p-Toluyl-Thr-Val, b = 4-MHB-Thr-Val).

4.4 Untersuchungen der Substratspezifität der C-Domänen des MeVal-Moduls von ACMSIII und D-Val-Moduls von ACMSII

Der Befund, dass die Enzyme ACM50, ACM56 und ACM53 überwiegend p-Toluyl-Thr-Val synthetisierten und nur in geringem Ausmaß p-Toluyl-Thr-MeVal war eventuell darauf zurückzuführen, dass die zweite C-Domäne dieser rekombinanten Peptidsynthetasen aus dem D-Valin-Modul der ACMSII stammt und dort D-Valin (und nicht N-Methyl-Valin) mit L-Threonin kondensiert. C-Domänen sind normalerweise bezüglich stromaufwärts befindlicher Substrate weniger selektiv als bezüglich stromabwärts gelegener Substrate (Mootz *et al.*, 2000). Es war deswegen von Interesse zu sehen, ob die C-Domäne des MeVal-Moduls vorzugsweise methylierte Dipeptide erzeugen würde, wenn sie statt der C-Domäne des D-Val-Moduls in diesen Konstrukten vorkommen würde. In Anbetracht der sehr hohen Ähnlichkeit des D-Valin Moduls und des MeVal-Moduls (auch in den C-Domänen) ließen sich Rückschlüsse auf die Determinanten ziehen, die für die Substratspezifität verantwortlich wären. Zur Erleichterung der Herstellung eines *acm53*-Analogen unter Einbeziehung der C-Domäne des MeVal-Moduls der ACMSIII wurde ACM53 dergestalt verändert, dass nicht nur die C-, A-, M-, T- und Te-Domäne des MeVal-Moduls der ACMSIII eingesetzt wurden, sondern auch noch die T-Domäne des MeGly-Moduls integral mit einbezogen wurde, so dass die T-Domäne des Thr-Moduls der ACMSII durch diese Domäne ersetzt wurde.

Für die Wahl des Fusionspunktes zwischen A- und T-Domäne der verschiedenen Actinomycinsythetasemodule wurde berücksichtigt, dass die Linkerregionen zwischen den A- und T-Domänen zwischen diesen alle gleich lang und sehr ähnlich zueinander sind. Interessanterweise sind die entsprechenden Bereiche im CDA-Gencluster hierzu ebenfalls sehr ähnlich, aber nicht ähnlich den Bereichen der Module des Bacitracin-Clusters oder in den Modulen der Gramicidin-S-Synthetase. Möglicherweise reflektieren alle diese intrinsischen Ähnlichkeiten innerhalb eines NRPS-Systems die Tatsache, dass die Module bzw. AT-Bereiche immer durch Genduplikation eines Vorläufermoduls in jedem einzelnen Genus entstanden sein könnten. Als variabel können diese Linker-Bereiche deshalb nur dann bezeichnet werden, wenn man ihre Konservierung mit der weitaus höheren Konservierung der Domänensignaturen vergleicht. Ein besonders hervorspringendes Motiv im Linker-Bereich der ACM- und CDA-Module stellt die Sequenz (T/A)GR am Anfang der T-Domäne, 10 AS hinter dem konservierten Leu-Rest der A-10 Signatur dar (Abb. 4.4-1). Die Restriktionsendonuclease Agel spaltet innerhalb der Hexanucleotid-Erkennungssequenz 5'-ACC GGT-3', die innerhalb eines Leserahmens die AS-Sequenz "TG" kodiert. Deshalb wurde die angestrebte A-T-Fusionierung ohne Störung der AS-Sequenz am Fusionspunkt TGR unter der Verwendung einer Agel-Schnittstelle vorgenommen.

84

ACMSII_1 :	NGKLDRAALP	EP-DFAL	∙AG <mark>TGR</mark> EARTPQEQI	CDLFTQVLGLP-	-RVGVDDDFFELGGHSL
ACMSII_2 :	NGKVDR <mark>A</mark> ALP	AP-EVSR	AGSVREPRTPREGL	GDLFAQALGVE-	-RVGLYEDFFALGGDSI
ACMSIIT1 :	NGKLDR <mark>A</mark> ALP	EP-DFAL	-AG <mark>TGR</mark> EARTPQ QI	CDLFAQVLGLP-	-WVGVDDDFFELGGHSL
ACMSIII_2 :	NGKLDR <mark>A</mark> ALP	AP-DFTL	-AG <mark>TGR</mark> EPRTPQEQI	CDLFTQVLGLP-	-RVGIDDDFFELGGHSL
ACMSIII_3 :	NGKLDR <mark>A</mark> ALP	AL-DPEH	-AD <mark>TGR</mark> APRTPQEQV	CELFAEVLGRP-	-LVGVDQDFFDLGGHSL
BacA1 :	NGKVDRKALP	EP-DRTAG-A	ENEYEAPRNETEEK	AAVWQDVLHVE-	-KAGIHDHFAQMGGHSL
BacA2 :	NGKVDKRTLH	DLAEQHTADEGQ	RGGRMLPENETQAM	LEIWKDIFGLD-	-SINLDVSYYEIGGDSL
BacA3 :	NGKVDKKSLP	VP-ERSVT-M	IDRRYEAPRDQMEEK	VSIWEEALGIN-	-KIGI <mark>NSH</mark> FF <mark>EAG</mark> GHSL
BacA4 :	SGKVDRSALP	EA-DGNVNVM-E	GTGYDPPRNEIERK	VQVWREILGAE-	-DIGISHHFFAAGGDSI
BacA5 :	NGKVDRKALP	·EP-DRSAG-1	EAEYEAPRNYVEQR	ISILEDVLGTE-	-RMGISCHFFDKGGNSL
BacB1 :	NG <mark>KA</mark> DLKALP	·EP-DRRAF-A	QARYEAPRNQTEAL	LSIWQDILPAE-	-QIGINDHFFDIGGHSL
BacB2 :	NGKIDRKALP	·EP-AGDVI-F	ASGYEAPRNETEEK	AAVWQEVLDRD-	-KIGINDNFFEIGGDSI
BacC1 :	NGKVDRKALP	·EP-DRTAG-I	LENEYEAPRNETEEK	AAIWRDILKVE-	-KSGINDHFFEMGGHSL
BacC2 :	N <mark>D</mark> KVDRKALP	AP-DRHVA-1	GAVYEAPRNDTEAK	VDIWRDVLGAG-	-DIGISHHFFAAGGDSI
BacC3 :	NGKIDRKALP	EP-SSTI-S	SEATYEAPRNRTEEK	VSIWEDVLGIE-	-NIGISHNFFELGGHSL
BacC4 :	NGKID TA ALP	·EP-QPG-F	KETEYEPPRNETEEK	VQIWEEVLGID-	-KIGITHHFFAAGGDSI
BacC5 :	NGKVD <mark>I</mark> KALP	EP-DRSAG-Z	LLEYEPPRHELEEK	AAIWEDILNIE-	-QIGINANIFDIGANSL
CDA_ps11 :	NGKLDRRALP	AP-AESG	RAAGRAPRTPGDEL	CALFAEVLGVA-	-EVRVDDGFFDLGGHSL
CDA_ps12 :	NGKLDTKALP	AP-AHAG	QVTGRA RGPR EI	CALFAEVLGVP-	-RLTVDDSFFDLGGHSL
CDA_ps13 :	NGKLDRKALP	AP-DYSA	RT <mark>SGR</mark> AARDPRORL	TALFGEILGVE-	-PAGVDDGFFDLGGDSI
CDA_ps14 :	NGKLDRTALP	AP-AYSA	STAGRAPRTPROEV	CTLFAEVLGVD-	-LVTIDDNFFDLGGHSL
CDA_psi5 :	NGKLDRIALP	AP-AYSA	STTGRTPRTPREEL	CTLFAEVLGVD-	-LVTIDDNFFDLGGHSL
CDA_psi6 :		AP-DYGA	ASTGRAARTPA EL		
CDA_psz1 :	NGKLDRIALP	AP-AYSA	-ST <mark>TGR</mark> TPRTPREEL	CTLYSELLSVN-	-TVGIDDSFFDLGGHSL
CDA_pszz :	NRKLDRKALP	AP DY AR	-EPVGRGPRDPREEL	CALFAEVLGVA-	
CDA_ps2_3 :	NGKLDRGRUP		-AG <mark>TGR</mark> APVTAREEL	CALFAEALGLE-	
CDA_ps31 :	NGKLDRAALP	AP-TYTG	WECREDE DE DE L	CDLYAEVISLP-	-GVTVDDDFFDLGGHSL
CDA_ps5_2 :			DVDVEADDNETEEM		- LUGLDDGFFDLGGHSL
GISAI:				AKINEEVI CIS-	- ALGINDIF TALGGUST
GreB 2 :		KP-DGFFGTA		ARTWEEVIGIS-	-VIGIODNEFEL CCHSL
GreB 3 ·		FP-DCSISIC	-TEYVAPRTMLECK	FEIWKDVI GLO-	- PVGTHDDFFTTCCHSL
GrsB 4 ·	NCKUDRKALP	EP-OTICIMA	-REYVAPRNETEAO		-LIGITONETELCOUST
MtaD 1 :	NGKVDRSAUB	AP-AELVEVP	PPAARAPGSDVERS	AATVOEVIOLO-	-EVDVHENFFDLGGTSV
MycA 1 :	NGKTNRKAUP	AP-EVSLE-C	TAEYVPPGNEVESK	AVI.WOEMIGTH-	-BVGTKHNFFDLGGNST
MycB 1 :	NGKTDEKALP	VA-DEKTR-N	ENEY TAPONSTEEL	ASTWOEVIGTE-	-BIGILDNFFDEGGDST
MycB 2 :	NGKINOKEIP	TR-DLOLO-I	RVAYKPPRTOVPOL	VSTWESVIGAE-	-KIGILDNFFDLGGDSI
MycB 3 :	NGKLNRNLUP	EP-DGKRYGD	-TEYVPPRNSTEMK	TKIWODVLGLE-	-OVGIRDNFFDIGGHSL
MycB 4 :	NGKVNR <mark>S</mark> ALP	LP-AAGMOTG	-IDHVAPRTRLEEO	VLIWKEVLKLE-	-OVGVKDNFFDLGGHSL
MycC 1 :	NGKIDRRALP	SP-RENL-1	GMDYTAPRTELEKI	AATWESVIGLE-	-RVGVSDHFFELGGDSI
MycC 2 :	NGKIDR <mark>E</mark> ALP	AP-DGNMLAG	-TEYAAPRTLIEKQ	AEIWKEVLAHS-	-ELGIKDNFFDVGGHSL
PchF 1 :	NGKIDRKALTG	FARQPQADLR	HGVAQAPADELENA	LALWREVLDNP-	-SLGVEQDFFGAGGDSL
SrfAA 1 :	SGKVDRRKLF	AL-EVKAVSG	-TAYTAPRNETEKA	AAIWQDVLNVE-	-KAGIFDNFFETGGHSL
SrfAA 2 :	NGKIDRRALP	IP-DANVSRG	-VSYVAPRNGTEQK	ADIWAQVLQAE-	-QVG <mark>AYDH</mark> FFDIGGHSL
SrfAA 3 :	NG <mark>K</mark> VDRKA <mark>L</mark> N	EP-DIEAG	SGEYKAPTTDMEEL	AGIWQDVLGMS-	-EVGVTDNFFSLGGDSI
SrfAB 1 :	NG <mark>KINKKE</mark> LP	AP-QSEAVQ	-PEYAAPKTESEKK	AEIWEGILG-V-	-KAGVTDNFFMIGGHSL
SrfAB 2 :	NGKTDRNALP	KP-NAAQSGG	-KALAAPETALEES	CRIWQKTLGIE-	-AIGIDDNFFDLGGHSL
SrfAB3 :	NGKVDRKALP	EP-DIEAG	SGEYKAPTTDMEEL	AGIWQDVLGMS-	-EVGVTDNFFSLGGDSI
SrfAC1 :	NGKVNKRLLP	KP-DQD-QLA	-EEWIGPRNEMEET	AQIWSEVLGRK-	-QIGIHDDFFALGGHSL
ТусА1 :	N <mark>D</mark> KIDRKALP	EP-DLTANQS	SQAAYHPPRTETESI	VSIWQNVLGIE-	-KIGIRDNFYSLGGDSI
ТусВ1 :	NGKTDRRALP	KP-EGSAKTK	-ADYVAPTTELEQK	VAIWEQILGVS-	-PIGIQDHFFTLGGHSL
ТусВ2 :	NGKVDRKALP	KP-EGKPATG	AAYVAPATEVEAK	VAIWENALGIS-	-GVGVLDHFFELGGHSL
ТусВ3 :	NDKIDRKALP	KP-NQEEN-F	RTEQYAAPQTELEQL	AGIWADVLGIK-	-QVGTQDNFFELGGDSI
ТусС1 :	NGKVERKKLP	KP-AGAVVTG	-TAYAAPQNEIEAK	AEIWQQVLGIS-	-QVGIHDDFFDLGGHSL
TycC2 :	NGKVDRKALP	QP-EDAAASA	-AVYVAPRNEWEAK	AAIWESVLGVE-	-PIGVHDHFFELGGHSL
ТусС3 :	NGKVDKKALP	KP-EGKPVTE	-AQYVAPTNAVE SK	AEIWERVLGVS-	-GIGILDNFFQICGHSL
TycC4 :	NGKVDRRALP	QP-SGERTTG	-SAFVAAQNDT AK	QQIWQEVLGIP-	-AIGIHDNFFEIGGHSL
TycC5 :		AP-DVTMLRT	TEYVAPRSVWOAR	AQVWEQVLNVP-	-QVGALDDFFALGGHSL
тусС6:	NGKVDRKALP	KP-QQSDATT	-REYVAPRNAT QQ	AAIWQEVIGVE-	-PIGITDQFFELCCHSL

Abbildung 4.4-1: Auszug aus einem Alignment des Übergangsbereiches zwischen Adenylierungs- und Thiolierungsdomäne in Modulen bakterieller NRPS-Cluster. Das Alignment erstreckt sich vom A10-Motiv der Adenylierungsdomäne bis zum 4⁺-PPant-Bindungsmotiv der Thiolierungsdomäne. Dort, wo das (T/S)GR-Minimotiv in den *linker*-Bereichen gefunden wurde, ist es blau unterlegt. Die Namen der Peptidsynthetasen und die jeweiligen Datenbankreferenzen sind in Abschnitt 2.12 aufgeschlüsselt.

4.4.1 Analyse der Anwendung des A-T-Fusionspunktes auf die Beladung der T-Domäne im Thr-Modul der ACMSII

Da die "TGR"-Signatur allerdings nicht in allen der betrachteten AT-Übergänge in NRPS-Modulen aus Streptomyceten vorkommt, wurde ein alternativer Fusionspunkt untersucht, der gegenüber der ursprünglichen Sequenz der ACMSII eine möglichst geringfügige Änderung in den AT-Linkerbereich einbringen sollte. Auswertungen der Alignments in Abb. 4.4-1 ließen es vernünftig erscheinen, hierfür eine *PstI-Schnittstelle* in den AT-Linkerbereich des ArhrT-Überganges einzubringen (in die Codons 7 und 8 nach dem Leucin-Codon des A10-Motives). Dabei bewirkt das Einbringen der *PstI-*Erkennungssequenz eine Änderung der AS-Sequenz in einer Position (LA->LQ). Die Einführung weiterer Fusionspunkte in diesen *linker-*Bereich hätte zu umfangreichen Sequenzänderungen auf Aminosäureebene geführt, die möglicherweise ähnliche Wirkungen in der Packung der Domänen zur Folge gehabt hätte, wie sie vermutlich durch das "EF" am EcoRI-Fusionspunkte in der Te-Fusion ausgelöst wurden. Daher wurden keine weiteren möglichen Fusionspunkte im A-T-*linker*-Bereich in Betracht gezogen.

Um die durch die Einführung der *PstI-Schittstelle* bewirkte Veränderung an einem funktionierenden Enzym zu prüfen, wurde der Genrumpf von *acm53* herangezogen. Die Fusionsschnittstellen (*PstI* bzw. *AgeI*) wurden durch PCR-Mutagenese eingeführt, gleichzeitig wurde hinter dem T-Domänen-kodierenden Teil des *acm53*-Gens ein Stopcodon gesetzt. Im Falle der Einführung der *AgeI-Schnittstelle* wurde das entsprechende bimodulare Proteinkonstrukt JMLACM1, im Falle der Einführung der *PstI-Schnittstelle* JMLACM2 genannt. Die kodierenden Gene *jmlacm1* und *jmlacm2* wurden in Plasmid pSPIJ005 unter Kontrolle des *acmA-*Promotors gestellt und in *S. lividans* TK64 exprimiert. JMLACM1 und JMLACM2 wurden partiell gereinigt. Beide Proteine konnten als Proteinbanden der erwarteten Größe (berechnet: 177 kDa) im SDS-PAGE gesehen werden. Beide Enzyme katalysierten die Thioester-Bildung mit Thr in vergleichbarem Maße (siehe Abb. 4.4.1-1).



Abbildung 4.4.1-1: Konstruktion und Testung JMLACM2. (A) Ableitung von JMLACM2 und JMLACM1 (Kontrolle ohne Änderung der AS-Sequenz am Fusionspunkt) von ACM53. (B) Alignment der Aminosäuresequenzen im A-T-Übergangsbereich des Thr-Modules von ACMSII, JMLACM1 und JMLACM2. Die durch die in *jmlacm1* und *jmlacm2* eingebrachten Fusionsschnittstellen kodierten Aminosäuren sind im Alignment rot hinterlegt. Nur in JMLACM2 führt das Einbringen der Fusionsschnittstelle auch zu einer Änderung der Aminosäuresequenze. (C) Aktivitätsprofil im Thr-Thioester und Proteingehalt bei der Präparation von JMLACM1 und JMLACM2 nach Gelfiltration an AcA32 (Bildung des Thr-Thioesters) (blaue Linie: Proteingehalt JMLACM1, rote Linie: Proteingehalt JMLACM2; schwarze Balken Aktivität JMLACM1, graue Balken: Aktivität JMLACM2).

Die Bildungsgeschwindigkeit des Thr-Thioesters an JMLACM2 wurde bestimmt. Der gefundene zeitliche Verlauf ist in Abb. 4.4.1-2 demjenigen Zeitverlauf bei der Selbstbeladung der ACMSII mit Threonin gegenübergestellt.



Abbildung 4.4.1-2: Zeitverlauf der Selbstbeladung von JMLACM2 (schwarze Quadrate) und ACMSII (rote Kreuze) mit ¹⁴C-Threonin. Insert: 5%-SDS Page der JMLACM2-Präparation nach Eluierung von Q-Sepharose FF (300 mM NaCI). Die Daten zur Selbstbeladung der ACMSII wurden der Dissertation A. Stindl (Berlin, 1993) entnommen.

Da die beiden Zeitverläufe gut übereinstimmen, kann gefolgert werden, dass die geringfügige Sequenzänderung, die aus dem Einbringen des *PstI-Fusionspunktes* in das kodierende Gen resultierte, keine signifikanten Auswirkungen auf die Fähigkeit des Thr-Moduls der ACMSII zur Selbstbeladung hatte.

4.4.2 JMLACM5, ein trimodulares Enzym mit N-Methyl-Aminosäure-spezifischer C-Domäne

Zur Herstellung des Konstruktes JMLACM5 wurde der Bereich T₂C₃A₃M₂T₃Te der ACMSII durch PCR amplifiziert. Hierbei wurde am 5'-Ende die Agel-Fusionsschnittstelle generiert, am 3'-Ende eine Xbal-Schnittstelle (223 bp hinter dem Stopcodon). Das Agel-Xbal-Fragment wurde in das *jmlacm1*-Genkonstrukt (ΔAgel/Xbal) insertiert, dadurch wurde das rekombinante NRPS-Gen *jmlacm5* generiert.



Abbildung 4.4.2-1: Konstruktion von JMLACM5. (A) Formale Ableitung JMLACM5 von ACM53 und ACMSIII. (B) Alignment der AS-Sequenzen im A-T-Übergangsbereich im Thr-Modul der ACMSII (ACMSII_M1), im Sar-Modul der ACMSIII (ACMSII_M2) und im rekombinanten Thr-Modul von JMLACM5. In der Sequenz von JMLACM5 sind die durch die Agel-Fusionsschnittstelle kodierten Reste rot hinterlegt.

Kurzzeit-Fütterungsexperimente mit S. *lividans* TK64, der mit *jmlacm5* transformiert worden war, mit p-Toluylsäure oder 4-MHB und radioaktivem Thr oder Val zeigten die Bildung von Aroyl-Thr-Val und Aroyl-Thr-MeVal, ebenso konnte die Freisetzung von Aroyl-Threonin beobachtet werden. Die Bildung dieser Produkte war auch schon bei entsprechenden Kurzzeit-Fütterungsexperimenten mit S. *lividans*, transformiert mit *acm53*, festgestellt worden. Der direkte Vergleich der Intensität der Banden dieser Verbindungen demonstrierte aber die im Vergleich mit ACM53 deutlich verstärkte Bildung von Arylcarboxyl-ThrMeVal durch JMLACM5 (siehe Abb. 4.4.2-2). Es kann vermutet werden, dass diese Änderung im Produktverhältnis auf die unterschiedliche

Herkunft der C-Domänen im jeweils letzten Modul der rekombinanten Peptidsynthetasen ACM53 und JMLACM5 zurückzuführen ist.



Abbildung 4.4.2-2: Kurzzeit-Fütterungsexperimente von S. lividans transformiert mit plOACM53 bzw. pJMLACM5. Den Kulturen wurde jeweils p-Toluylsäure (linke Hälfte der DC) oder 4-MHB (rechte Hälfte der DC) zugesetzt. Als ¹⁴C-Label wurden Threonin oder Valin angeboten (unterhalb der DC sind die jeweiligen Spuren entsprechend beschriftet). A: p-Toluyl-Threonyl-N-Methyl-Valin, B: p-Toluyl-Theonyl-Valin, C: p-Toluyl-Threonin.

4.5 NRPS-PKS-Hybridsynthetase JMLMyx-1

In vielen pharmakologisch relevanten Naturstoffen (Rapamycin, Bleomycin) sind Polyketidstrukturen direkt mit Peptidstrukturen kombiniert. Die Klonierung von Genclustern solcher Biosynthesesysteme hat gezeigt, dass in ihnen NRPS- und PKS-Module aufeinanderfolgen. Im Falle des Myxothiazol-Biosynthesesystems aus Stigmatella aurantiaca (Silakowski et al., 1999) wurden z.B. die Gene von 9 aufeinanderfolgenden Modulen in der in Abb. 4.4.3-1 gezeigten Abfolge identifiziert.



Abbildung 4.5-1: Genetische Organisation des Myxothiazol-Biosynthesegenclusters. Abbildung modifiziert aus Silakwoski et al., 1999.

Die Abfolge dieser Module sowohl hinsichtlich ihrer Natur als PKS oder NRPS-Module und ihrer abgeleiteten Substratspezifitäten erklärt in anschaulicher Weise den Syntheseprozeß des Myxothiazols. Interessanterweise liegen im Myxothiazolgenensemble nicht nur PKS- oder NRPS-Enzyme hintereinander vor, sondern auch ein Mischenzym, in dem ein NRPS-Modul direkt mit einem PKS-Modul fusioniert ist (MtaD). Diese beiden Module wurden in der Art von der Natur fusioniert, dass auf die T-Domäne des NRPS-Moduls direkt die KS-Domäne des PKS-Moduls folgt. Um das PKS-Modul des MtaD anstelle des MeVal-Moduls in JMLACM5 zu platzieren, wurden zunächst die Übergänge zwischen der T-Domäne des Thr-Moduls und der C-Domäne des Val-Moduls in ACM53 sowie zwischen der T-Domäne und der KS-Domäne in MtaD verglichen. Da einerseits keine augenfälligen Ähnlichkeiten dieser Übergänge festzustellen war, andererseits die Untersuchungen an JMLACM2 und JMLACM5 den Schluss zuließen, dass der A-T-Übergangsbereich der Actinomycin-NRPS-Module gegenüber Fusionierungen robust sind, wurde beschlossen, das PKS-Modul von MtaD mitsamt der PCP-Domäne seines NRPS-Moduls direkt hinter die ThrA-Domäne von pACM53 zu setzen. Hierfür bot sich die bei der Konstruktion von JMLACM5 erfolgreich verwendete Agel-Stelle an.



Abbildung 4.5-2: Konstruktion von JMLMyx-1. (A) Ableitung für JMLMyx-1 von JMLACM5 und MtaD. **(B)** Alignment von ACMSII, MtaD und JMLMyx-1 im Bereich des Agel-Fusionspunktes. Die durch die Agel-Fusionsschnittstelle kodierten Aminosäuren sind rot hinterlegt.

Zunächst wurde der für die Thiolierungsdomäne des NRPS-Moduls von MtaD kodierende Bereich von mtaD durch PCR amplifiziert, wobei durch Mutagenese das Amplifikat mit der Agel-Fusionsschnittstelle an einer Position entsprechend bp 3943 von mtaD ausgestattet wurde. Der für das PKS-Modul kodierende Bereich des mtaD-Gens wurde als genomisches Fragment bereitgestellt und über eine natürliche Restriktionsschnittstelle mit dem durch PCR amplifizierten Fragment verbunden. Nach Spaltung mit Agel wurde dieses in Agel geschnittenes pJMLACM5 insertiert. Dies ergab das Gen jmlmyx-1, das in pSPIJ005 unter Kontrolle des acmA-Promotors stand (für den genauen Klonierungsweg wird auf Abschnitt 3.2.16 verwiesen). Die Transformation des resultierenden Plasmides pJMLMyx-1 in S. lividans TK64 verlief mit einer um den Faktor 10-50 geringeren Transformationseffizienz als bei den reinen Streptomyces-Genkonstrukten. Außerdem wurde bei den Routinekontrollen der aus den Streptomyces-Transformanden isolierten Plasmid-DNA festgestellt, dass bei etwa 75% der Transformanten die Restriktionsanalysen der Plasmide ein von pJMLMyx-1 abweichendes Aufspaltungsmuster aufwiesen. Zudem wurde gefunden, dass sich das Plasmid auch bei längerer Haltung von transformierten S. lividans veränderte. Diese offensichtliche Instabilität des Expressionsplasmides pJMLMyx-1 trat dagegen in E. coli auch bei mehrfacher Retransformation nicht auf.

Unter Berücksichtigung dieser Instabilität und steter Verwendung frischer Transformanten konnte S. lividans / pJMLMyx-1 auf Expression des Hybridenzyms untersucht werden.

Partielle Reinigung des resultierenden Enzyms und seine Testung ergab, dass das Protein, das als 380 kDa-Bande im SDS-PAGE gesehen werden konnte (Abb. 4.5-3 B), Threonin kovalent ATP-abhängig band. Dies zeigt, dass die A-Domäne des Thr-Moduls der ACMSII in der Lage ist, die T-Domäne des NRPS-Moduls von MtaD mit Threonin zu beladen. Eine weitere Aufreinigung des Enzyms durch Ionenaustauscherchromatographie an Q-Sepharose war nicht erfolgreich, da das Protein an Ionenaustauschern aus nicht geklärten Gründen seine Aktivität verlor.



Abbildung 4.5-3 Präparation und Testung JMLMyx-1 (A) Gelfiltration eines Proteinextraktes aus S. lividans (pJMLMyx-1) an AcA34, Profil des Aktivitätsverlaufes im Thr-Thioester (Balken) und der Proteinkonzentration (rote Linie). (B) Coomassie gefärbtes 5%-Polyacrylamidgel der von AcA34 eluierten Fraktionen 15-22 (korrespondierend zu dem unter B gezeigten Aktivitätsprofil). Als Größenstandard wurde die Enniatin-Synthetase (340 kDa, Spur M) aufgetragen (K = Proteinextrakt aus S. lividans/pSPIJ005). Für JMLMyx-1 wurde eine Größe von 380 kDa berechnet. (C) Schematische Darstellung der Produktbildung an JMLMyx-1. (D) Autoradiogramm der dünnschichtchromatographischen Analyse der Produktbildung an JMLMyx-1 im zellfreien System (a = p-Toluyl-Thr, b = 4-MHB-Thr). (E) Strukturformel von (N)-p-Toluyl-4-Amino-2-Keto-5-Hydroxyhexansäure (1); die Bildung von (1) durch JMLMyx-1 wäre unter den Inkubationsbedingungen zu erwarten gewesen, konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

Inkubation des an AcA32 gereinigten Proteins JMLMyx1 in Anwesenheit von p-Toluylsäure oder 4-MHB und ATP und Isolierung der Intermediate zeigte die Bildung von p-Toluyl-Thr bzw. 4-MHB-Thr. Die Bildung von (N)-p-Toluyl-4-Amino-2-Keto-5-Hydroxyhexansäure (des hypothetischen Produktes von JMLMyx-1, siehe Strukturformel in Abb. 4.5-3 E) in zusätzlicher Anwesenheit von Malonyl-CoA wurde nicht festgestellt.

Die Daten zeigen, dass T-Domänen robust sind und unabhängig von ihrer Herkunft aus einem reinen NRPS-System oder von einem NRPS-PKS-Übergang in Fusionskonstrukten funktionell aktiv bleiben. Dies wurde auch bei Klonierungsexperimenten von Frank Pfennig (ehemals Actinodrug Pharmaceuticals) an *redL* (*Streptomyces coelicolor*) festgestellt (F. Pfennig, pers. Mitteilung).

4.6 Untersuchungen an den Promotoren der Actinomycinsynthetasegene aus S. chrysomallus

4.6.1 Kartierung der Promotoren der Actinomycinsynthetasegene

Aus der entgegengesetzten Anordnung der Gene *acmA* und *acmD* einerseits sowie *acmB* und *acmC* andererseits kann man schließen, dass die Promotoren dieser Gene in dem ca. 800 bp großen intercistronischen Bereich zwischen *acmA* und *acmB* liegen müssen. Dieser Bereich sowie die angrenzenden Actinomycinsynthetasegene wurden im AK Keller sequenziert. Dabei wurde als herausstechendes Merkmal des intercistronischen Bereiches ein großer *inverted repeat* gefunden, dem eine eventuelle Funktion als regulatorisches *cis*-aktives Element zugeordnet wurde; auch wurden putative Shine-Dalgarno-Sequenzen identifiziert; Kartierungsexperimente wurden jedoch nicht durchgeführt (Dissertation Pfennig, 1998).

Um nun eine Analyse des intercistronischen Bereiches vorzunehmen, wurde dieser zusammen mit dem acmA-Gen (plOacmA) oder dem acmB-Gen (plOacmB) in ein autonomes Plasmid kloniert und in *S. lividans* TK64 transformiert. Um den Nachweis des Genproduktes des acmA-Gens zu erleichtern, wurde (unter Nutzung einer internen singulären EcoRI-Schnittstelle) der hintere Teil des Wildtypgens durch den aus dem Plasmid pACMA10 (Dissertation Pfennig, 1998) entnommenen acmA-Rumpf mit künstlicher His6-kodierender Sequenz ersetzt.

Für S. *lividans* TK64, transformiert mit plOacmA, konnte das Genprodukt von *acmA*+His₆ sowohl durch Immunblotanalyse von Rohextrakten (Abb. 4.5.1-1 A+B) als auch enzymatisch anhand der ACMSI-Aktivität nachgewiesen werden.

Transformation von *S. lividans* mit plOacmB und SDS-gelelektrophoretische Analyse des Proteinextraktes des transformierten Stammes zeigte die erwartete Proteinbande von 280 kDa Größe, die im Kontrollstamm nicht vorhanden war (Abb. 4.5.1-1 C). Da die Expression von *acmA* im Plasmid auch in entgegengesetzter Orientierung der Gen-Promotorkassette zum Plasmidrumpf zu beobachten war (vgl. Klonierungsweg in Abschnitt 3.2.17), wurde geschlossen, dass diese Gene unter der Kontrolle ihrer eigenen Promotoren und nicht eines plasmidkodierten Promotors standen. Diese Promotoraktivitäten mussten auf den 5'-Bereichen von *acmA* und *acmB* liegen.

Interessanterweise wurde das *acm*A-Gen des Plasmids plOacmA nach Transformation des Actinomycinproduzenten *S. chrysomallus* auch in diesem Stamm exprimiert. Etwa 30% der Gesamtaktivität der ACMSI lagen als His₆-Fusionsprotein vor. Der Befund, dass der transformierte Stamm keine signifikante Steigerung der
Actinomycinproduktion aufwies, könnte dahingehend interpretiert werden, dass der Gehalt an ACMSI in *S. chrysomallus* nicht limitierend für die ACM-Synthese ist.



Abbildung 4.6.1-1: Expression von acmA und acmB in S. lividans unter Kontrolle ihrer eigenen Promotoren. AcmA wurde als carboxyterminales His₆-Fusionsprotein vom Plasmid plOacmA exprimiert. (A) SDS-PAGE-Analyse von Rohextrakten (50µg Protein pro Spur) von TK64/plOSPIJ005 (Spur 1) und S. lividans TK64/plOacmA (Spur 2). Spur 3 zeigt die gereinigte ACMSI nach Affinitätschromatographie an Ni-Agarose. (10% Polyacrylamidgel) (B) Immunoblot-Analyse derselben Rohextrakte mit einem anti-His₆-Antikörper. (C) SDS-PAGE-Analyse der Rohextrakte aus S. lividans TK64/pSPIJ005 (Spur 1) und S. lividans TK64/plOacmB (Spur 2) (50µg Protein pro Spur). Es konnte die Bildung von ACMSII nachgewiesen werden (Pfeil). (5% Polyacrylamidgel).

4.6.2 Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes des acmA-Gens

Gesamt-RNA aus mit plOacmA transformierten 72 h alten S. lividans-Kulturen wurden mit zwei zum acmA-Gen komplementären Primern (mit 62 bzw. 100 nt Abstand zum Translations-Startcodon des acmA-Gens) zur primer extension mit reverser Transkriptase eingesetzt. Die Primer wurden parallel für die Generierung einer Sequenzleiter des relevanten Bereiches eingesetzt, um die reversen Transkripte in der Gelelektrophorese kartieren zu können. Abbildung 4.6.2-1 zeigt, dass bei der Verwendung von Primer acmAlO151101 zwei Startpunkte der Transkription für acmA auffreten. Diese liegen 22 bp auseinander und sind 49 bzw. 71 nt vom Translations-Startcodon des acmA-Gens entfernt. Dem Transkriptionsstartpunkt im Abstand von 49 nt vom Translationsstartcodon wurde der Promotor mit der Bezeichnung acmA-p1 Transkriptionsstartpunkt zugeordnet, dem im Abstand von 71 nt zum Translationsstartcodon der Promotor mit der Bezeichnung acmA-p2.



Abbildung 4.6.2-1: Kartierung der Transkriptionsstartpunkte (tsps) der acm-Gene durch primerextension. Gezeigt sind die Autoradiogramme der gelelektrophoretischen Auftrennung der Reaktionsprodukte. (A) Bestimmung der tsps von acmA. (B) Bestimmung des tsp von acmB. Unter Verwendung der Primer, die auch für die primer-extension-Experimente eingesetzt wurden, wurden auch die Sequenzierungsreaktionsprodukte erzeugt, die als Größenstandard (Spuren C, T, A, G) eingesetzt wurden. Spur 1 und Spur 2 zeigen dieselben Signale, Spur 2 entspricht jedoch einer verlängerten Expositionszeit auf dem Röntgenfilm. Die Nucleotidsequenzen, welche die tsps umgeben (die Startpunkte sind jeweils mit einem Stern gekennzeichnet) sind links neben der jeweiligen Sequenzleiter wiedergegeben.

4.6.3 Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes des acmB-Gens

Primer extension mit RNA aus mit plOacmB transformierten *S. lividans* mit den Primern acmBIO311001 und acmBIO151101 (mit 50 bzw. 100 nt Abstand zum Translations-Startcodon von *acmB*) ergaben nur einen einzigen Trankriptionsstartpunkt (acmB-p) in 181 nt Entfernung vom Translations-Startcodon des *acmB*-Gens (Abb. 4.6.2-1).

4.6.4 Transkriptionelle Analyse von acmA und acmB in Streptomyces chrysomallus

Bei der Durchführung von *primer extension* Experimenten mit gesamt-RNA aus Streptomyces chrysomallus blieb die Menge der detektierbaren reversen Transkripte stets geringer als bei Durchführung der Experimente mit gesamt-RNA aus den S. *lividans*-Transformanten. Dies ist vermutlich auf eine geringere Konzentration der jeweiligen mRNA zurückzuführen und reflektiert eventuell den Umstand, dass die transkribierten Gene in S. chrysomallus nur in Einzelkopie vorliegen, während sie in den S. lividans-Transformanten auf Plasmiden mit hoher Kopienzahl situiert sind. Auch ist nicht auszuschließen, dass S. chrysomallus ein höheres Niveau intrinsischer Ribonuclease-Aktivitäten aufweist als S. lividans, was sich in höheren mRNA Verlusten während der Präparation äußern könnte. Letztendlich war es aber möglich, in der gelelektrophoretischen Auftrennung der primer-extension-Produkte anhand der bekannten Laufweite der reversen Transkripte von S. lividans-mRNA die Signale der entsprechenden reversen Transkripte von S. chrysomallus-mRNA zu lokalisieren. Anhand dieser Signale wurde geschlossen, dass die Transkriptionsstartpunkte acmAp2 und acmB-p sowohl für die Transkription ihrer Gene von Plasmiden in S. lividans als auch von chromosomaler Position in S. chrysomallus genutzt werden. Der Transkriptionsstartpunkt acmA-p1 konnte nur bei Verwendung von gesamt-RNA aus S. lividans, nicht aber aus S. chrysomallus nachgewiesen werden.

4.6.5 Analyse der Promotoren der acm-Gene

Sequenzanalysen der Gene acmA/D und acmB/C zeigten, dass acmA und acmD mit ihren 3'- bzw. 5'-Enden überlappen, ebenso acmB und acmC. Aus diesem Grunde ist es hochwahrscheinlich, dass diese Gene transkriptionell gekoppelt sind und unter der Kontrolle desselben jeweiligen Promotors stehen. acmA und acmB haben -10 und -35-Bereiche, die in Abb. 4.6.5-1 gezeigt sind. Diese haben Ähnlichkeit zu σ^{70} -abhängigen Promotoren aus Streptomyces und E. coli. Die –35-Boxen von acmA-p2 und acmB-p haben Ähnlichkeit zu der E. coli-Konsensussequenz "TIGACA" für die Erkennung des -35 – Bereiches, diese ist allerdings für beide Promotoren um eine Base verkürzt. Außerdem weisen acmA-p2 und acmB-p -10-Boxen mit Ähnlichkeit zur TATNNT-Signatur von E. coli σ^{70} -Typ Promotoren auf. Die Ahnlichkeit der entsprechenden Sequenzbereiche von acmA-p1 zum E. coli σ^{70-} Konsensus hingegen ist geringer, zudem sind sich acmB-p und acmA-p2 zueinander wesentlich ähnlicher als zu jeweils zu acmA-p1. Eine weitere Suche mit verschiedenen publizierten Promotorsequenzen aus Streptomyceten (Bourn und Bapp, 1995, Strohl, 1992) zeigte bemerkenswerterweise die höchste Ähnlichkeit zu –10 und -35 Promotoren von Amylasegenen aus verschiedenen Streptomyceten und dem Promotor des malE-Gens (Maltose-Aufnahmesystem) aus Streptomyces coelicolor sowie zum dagAp4-Promotor (ebenfalls aus Streptomyces coelicolor). Ahnlichkeit wurde auch zu dem veg-Promotor aus Bacillus subtilis festgestellt.

97

Promotor	5´	-35	-	-10	tsp	3´
acmA1-p	TCGCO	GGCCGTGTTAGCTTCGCCATCGCC	GAATGT-	-CAGAAT	TTCCG	GC
acmA2-p	TGTCO	GCGTCC <u>TTGCCC</u> GCCGTCTCGCG	GCCGTGI	TAGCTT	CGCCA	TC
acmB-p	TTGAC	GCCACCC <u>TTGACC</u> CCTCCAGCACC	CCGAGT-	TAGGTT	GCCAA	AC G
E. coli consensus		<u>TTGACA</u>		TATAAT		
<pre>amlV-p (S. venezuleae)</pre>	CGTC	CGGAGGG <u>TTGACC</u> GGGCGTCGGGG	CACTCG-	TACGGT	CACGO	GCT G
aml-p (S. limosus)	TGTCO	CAAAGGG <u>TTGACC</u> GCGGGTACCGC	ICGCTC-	TACGGT	CTGCI	TC G
<pre>amySG-p (S. griseus)</pre>	TGTCO	CAAAGGG <u>TTGACC</u> GCGGGTACCGC	ICGCTC-	TACGGT	CTGCI	TC G
<pre>amlB-p (S. lividans)</pre>	GCG	GGAGGGG <u>TTGACC</u> GTGGTTGAAGG	CCGCCCI	TACGGT	CACGA	AC C
<pre>malE-p (S. coelicolor)</pre>	GCAGCA	AAGACCT <u>TTCGCC</u> AGGCTTTCAAC	GCTGT	-TACGTT	CACGI	CG
dag-p4 (S. coelicolor)	CAGCCO	GTACCGA <u>TTGTCA</u> CCCTGCGACAC	ICCGCTO	GTAGCAT	rcgge	GAA a
veg-p (B. subtilis)	TTTAAA	ATTTTAT <u>TTGACA</u> AAAATGGGCTCO	GTGTTG-	TACAAT	AAATO	GT A

Abbildung 4.6.5-1: Alignment der acm-Promotoren mit Streptomyces-Promotoren carbonkatabolitreprimierter Gene, dem veg-Promotor aus Bacillus subtilis und dem E. coli-Konsensus für σ^{70} abhängige Promotoren. Die –10 und –35 – Regionen sind unterstrichen, die jeweiligen Startpunkte der Transkription sind fett gedruckt.

Es wurde gezeigt, dass die aml- bzw. mal-Gene durch die Anwesenheit von Stärke oder Maltose induzierbar sind. Im Falle der Amylase-Gene aus Streptomyces limosus, S. lividans und des malE-Gens aus S. coelicolor sind putative Operatorsequenzen beschrieben worden; diese bestehen aus 6 oder 7 bp langen inverted oder directed repeats und weisen unterschiedlich lange Abstände zueinander auf. Auch ihre Lage relativ zu den Transkriptionsstartpunkten ihrer Gene ist variabel (Nguyen et al., 1997, Nguyen, 1999). Den beschriebenen putativen Operatorsequenzen ist ein Konsensus-Motiv 5'-CTTGCC-3' gemeinsam. Kurze konservierte IR- und DR-Sequenzen in den Bereichen der Promotoren der acmA- und acmB-Gene haben signifikante Ähnlichkeit zum Konsensus dieser putativen Operatoren in den Promotorregionen der Amylase- und Chitinasegene (Tabelle 4.6.5-1). Drei directed repeats sind im Leader von acmB enthalten, während sich im Promotorbereich des acmA-Gens ein directed und ein inverted repeat partiell überlappen (Abb. 4.6.5-2).

Tabelle	4.6.5-1:	inverted	und	directed	repeats	mit	putativer	regulatorische	r Fur	nktion	im	Bereich	der
acm-Pro	omotore	n											
-	-				•	F .			<u>0</u> ,		1		

Gen	Repeats	Position des 5'- Nucleotides	5'- Teil	Abstand (nt)	3'- Teil
acmB	Direct	+ 98	CTTCGCC	12	CTTCGCA
acmB		+ 117	CTTCGCA	11	TTTCGCT
acmA		- 37	CTTGCCC	21	CTTCGCC
Konsensus			CTTCGC		CTTCGC
acmA	Inverted	- 9	CTTCGCC	3	GCCGAAT

Die Promotorregionen der Amylase- und Chitinasegene aus S. limosus und S. lividans enthalten putative Operatorsequenzen mit dem Motiv GN₄CGN₄C (Nguyen et al., 1997), die Ähnlichkeit zu Operatorsequenzen der Katabolit Repression aus Bacillus subtilis aufweisen. In Bacillus subtilis wurden zahlreiche solche Operatorsequenzen im Promotorbereich Carbon-Katabolit-reprimierbarer Gene identifiziert, Modellsystem ist die Operatorsequenz amyO (Weickert und Chambliss, 1990), die dem Repressor CcpA (Catabolite control protein A, Henkin *et al.*, 1991) als Bindungsstelle dient (Kim *et al.*, 1995).

Zwei Sequenzen dieses Typs wurden auch in den acm-Promotoren gefunden (bezeichnet mit O1 und O2, Tabelle 4.5.6-2). O1 ist stromaufwärts von acmA-p2, während O2 stromauf von acmB-p bei nt +29 bis nt +40 lokalisiert ist. Beide putative Operatorsequenzen haben die korrekte Orientierung in Bezug auf die stromabwärts gelegenen Gene.

Operator/Gen	Position	Sequenz	Sequenz Organismus		Quelle
01 (<i>acmA</i>)	- 63	G TCGG CG GGCA C	s.	chrysomallus	diese Arbeit
O2 (acmB)	+28	G GTAC CG ACGG C	s.	chrysomallus	diese Arbeit
Aml	-116	G CTTG CG CGCC C	s.	limosus	Virolle and Bibb (1988)
Amy	+1	G GGGT CG GACC C	s.	lividans	Tsao <i>et al.</i> (1993)
Chi	+5	G TGGC CG CCGT C	s.	lividans	Miyashita and Fujii (1993)
AmyO	-3	G TAAG CG TTAA C	В.	subtilis	Weickert and Chambliss (1990)
AcsA	-35	G AAAA CG CTTT A	В.	subtilis	Grundy et al. (1994)
AcuA	+39	G AAAG CG TTAC C	В.	subtilis	Grundy et al. (1994)

Tabelle 4.6.5-2: Putative Operatorsequenzen mit Ähnlichkeit zu amyO

Die Präsenz dieser Operator-Motive könnte bedeuten, dass die acm-Synthetasegene unter möglicher Carbon-Katabolit-Kontrolle oder Katabolit-Repression stehen. Dies ist für die Actinomycinsynthese in *Streptomyces antibioticus* ausführlich beschrieben (Gallo und Katz, 1971), im Falle von *Streptomyces parvulus* ist allerdings ein solcher Glucose-Effekt nicht eingehend untersucht worden (Williams und Katz, 1977).

Abbildung 4.6.5-2 zeigt die gesamte Sequenz des intercistronischen Bereiches zwischen *acmA*- und *acmB*-Gen mit den für diese Gene gefundenen Transkriptionsstartpunkten sowie den putativen regulatorischen Elementen.

ACACGTTTCA T GTG CAAAGT 	ACCTCCGATG T <u>GGAGG</u> CTAC RBS	ATTCCCCCGC TAAGGGGGGCG	GCGGACGGCC CGCCTGCCGG	GGAGAGCGAA CCTCTCGCTT
ААСТСААТАТ ТТСАСТТАТА Ц	CCTGCGAAGG GGACGCTTCC	CTCAAATGAT GAGTTTACTA	GGGCGAAGTG CCCGCTTCAC	GTCGGCAGGA CAGCCGTCCT
CGGGAATGGG GCCCTTACCC	TGCGCCTGGC ACGCGGACCG	CGACATTCGC GCTGTAAGCG	GCGACAGGAC CGCTGTCCTG	O2 GGAAC <mark>G</mark> CCGT CCTTG <mark>C</mark> GGCA
CCGTACCGGG CCCATGCCCC	CGGCAGCTGG GCCGTCGACC	TCGGAAAGCA AGCCTTTCGT	AAGTCGTTGG TTCAGCAACC	CAACCTAACT G <u>TTGGAT</u> TGA -10
CGGGGTGCTG GCCCCACGAC	GAGGGGTCAA CTCC <u>CCAGTT</u> -35	GGGTGGCTCA CCCACCGAGT	AGCCGGTGTC TCGGCCACAG	IR1 CCGCCGGCGG GGCGGCCGCC
GACACCGGCT CTGTGGCCGA	CGGGAGATCG GCCCTCTAGC	CCGAAGTGCT GGCTTCACGA	GCCGGTCAGA CGGCCAGTCT	GGCTTGTCGG CCGAACAGCC
01 GTCGGCCGGCC CAGCCGCCCG	► IR. ACTGATCGTC TGACTAGCAG	2 GGCGTCC <u>TTG</u> CCGCAGGAAC	5 CCC GGGCGGCAGA	CGCGGCCGTG GCGCCGGCAC
-10/-35 <u>TTAGCT</u> TCGC AATCGAAGCG	CATCGCCGAA GTAGCGGCTT	-10 TGT <u>CAGAAT</u> T ACAGTCTTAA	TCCGGCTTCC AGGCCGAAGG	IR3 GGGATTTGGA CCCTAAACCT
AGCCACCGGA TCGGTGGCCT	DR ATTTCCCCAT TAAAGGGGTA	RBS AA <u>GAGGAA</u> GC TTCTCCTTCG	fm A TGGT ATG GCC ACCATACCGG	D K W GATAAATGGT CTATTTACCA

Abbildung 4.6.5-2: Nucleotidsequenz der intercistronischen Region zwischen den Genen acmA und acmB. Die Startcodons der Translation sind fett geschrieben und mit breiten Pfeilen, die den jeweiligen Gennamen umfassen, gekennzeichnet. Putative Ribosombindungsstellen (RBS) sind doppelt unterstrichen. Die Transkriptionsstartpunkte werden durch gebogene Pfeile gekennzeichnet. –10 und –35 Konsensussequenzen sind fett geschrieben und einfach unterstrichen. Inverted repeats (IR) werden durch ausgezeichnete Pfeile angegeben, direct repeats (DR) durch gepunktete Pfeile. Putative Operatorsequenzen mit Homologie zu Operatorsequenzen (amyO) der Carbon-Katabolitrepression in Bacillus subtilis (O1 and O2) sind vor dunklem Hintergrund geschrieben, Motive mit Ähnlichkeit zu putativen MaIR-Bindungsstellen sind eingeklammert.

4.6.6 Einfluss von Kohlenstoffquellen auf die Actinomycinproduktion von S. chrysomallus

Um den Einfluss unterschiedlichen Kohlenstoffquellen auf die von Actinomycinproduktion in S. chrysomallus zu untersuchen, wurden Wachstumskurven in einem chemisch definierten Medium mit verschiedenen Kohlenstoffquellen aufgenommen. Es wurden die Biomassen und Actinomycintiter bestimmt. Der pH-Wert der Kulturen wurde überwacht, um unterschiedliche pH-Werte in Glucose- und Maltose-supplementierten Medien auszuschließen. Desgleichen wurden Wachstumskurven von S. chrysomallus in komplexen Medien, die ebenfalls mit verschiedenen Kohlenstoffquellen supplementiert wurden, aufgenommen. Messungen des Verlaufes der Actinomycinproduktion während der Kultivierung im chemisch definierten Medium sind in Abbildung 4.6.6-1 gezeigt.

Im synthetischen Medium wurde Actinomycin sowohl in Gegenwart von Maltose (als schwer verwertbarer Kohlenstoffquelle) als auch von Glucose gebildet, dies aber in unterschiedlichem Ausmaß, auch zeigte der Bildungsverlauf eine andere Form. Im Falle des mit Maltose supplementierten Mediums steigt der Actinomycintiter bis etwa zur 72. Stunde der Kultivierung konstant an, danach bleibt er annähernd konstant. Auch im mit Glucose supplementierten Medium ist ein über einen langen Zeitraum erfolgender gleichmäßiger Anstieg des Actinomycintiters festzustellen, allerdings erfolgt die Actinomycin-Produktion hier langsamer als im Maltose-supplementierten Medium. Im Glucose-supplementierten Medium hält jedoch hält der konstante Anstieg des Actinomycintiters jedoch auch über die 72. Stunde der Kultivierung hinaus an, so dass nach langer Fermentation der in Glucose-gewachsenen Kulturen erreichte Actinomycintiter dem in Maltose-gewachsenen Kulturen erzielten Plateau nahekommt.

In beiden Kulturen ist der Verlauf der Biomassen ungefähr gleich, nach etwa 40 h ist das Wachstum beendet, zudem ist der pH konstant in Gegenwart jeglicher C-Quelle.



Abbildung 4.6.6-1: Wachstumskurven von S. chrysomallus SCI in Minimal- und Vollmedium unter Supplementierung mit Glucose oder Maltose. Bestimmt wurden Actinomycintiter (obere Graphen, Balken, linke Achse), Biomasse (Feuchtgewicht; obere Graphen, Punkte, rechte Achse), die spezifische Aktivität von ACMSI (untere Graphen, Balken, linke Achse) und spezifische Aktivität von ACMSII und ACMSIII (durch Bestimmung des Valin-Thioesters gemeinsam gemessen, untere Graphen, Punkte, rechte Achse). Die Werte für Wachstumskurven für Maltose-gewachsene Kulturen sind als einfach schraffierte Balken bzw. als Quadrate dargestellt, die Werte für Wachstumskurven Glucose-gewachsener Kulturen als kreuzschraffierte Balken bzw. als Kreise.

Bei der Kultivierung in einem maltose-supplementierten komplexen Medium wurde gefunden, dass die Actinomycinproduktion in etwa denselben zeitlichen Verlauf nimmt wie im maltose-supplementierten synthetischen Medium, allerdings wurden hier in etwa doppelt so hohe Absolutwerte gemessen. Im Glucose-supplementierten komplexen Medium erreicht der Actinomycintiter ein Plateau, dessen Niveau deutlich unter dem bei Maltose-Supplementierung zu erreichenden Niveau liegt. Dies lässt darauf schließen, dass auch in diesem Medium Glucose einen weniger Einfluss auf die Actinomycin-Produktion stimulierenden hat als Maltose. Bemerkenswert an diesem Befund ist, dass auch im komplexen Medium sowohl in Gegenwart von Glucose als auch von Maltose sehr frühzeitig die Synthese von Actinomycin zu beobachten ist, während bei S. antibioticus in komplexen Medien mit Glucose normalerweise keine Actinomycinsynthese zu beobachten ist (Gallo und Katz, 1971). Dieser Befund könnte so interpretiert werden, dass im Gegensatz zu S. antibioticus die Actinomycinbiosynthese in S. chrysomallus möglicherweise partiell von Glucose de-reprimiert ist.

Ähnliche Ergebnisse wurden auch bei der Kultivierung von S. *chrysomallus* in anderen komplexen Medien (HMM/HMG) erzielt; auch hier zeigte die Actinomycinsynthese einen Glucose-Effekt.

4.6.7 Vegetative Expression der acm-Synthetasegene in S. chrysomallus

Im Hinblick auf den Glucose-Effekt auf die Actinomycinbildung war es von Interesse zu sehen, ob ein solcher Effekt auch für die Expression der ACM-Synthetasegene festzustellen wäre. Ergebnisse von Messungen der ACMSI und ACMSII/III in DEAEfraktionierten Proteinextrakten von Zellen aus verschiedenen Kulturstadien und Medien sind in Abb. 4.6.6-1 gezeigt. Die Abbildung zeigt klar, dass in chemisch definiertem Medium in Gegenwart von Glucose bis 36 Stunden ein Anstieg der spezifischen Aktivität von ACMSI auftritt. Der Verlauf der Bildung von ACMSII/ACMSIII war praktisch gleich. Überraschenderweise fiel die Enzymmenge nach 36 h drastisch ab. Nach dieser Zeit war auch beim Wachstum nur noch ein geringer Zuwachs festzustellen. Praktisch ging die Enzymbildung mit dem Wachstum einher, mit dem Erreichen der stationären Phase klingt sie rasch ab. Da vom Gehalt der Synthetasen her keine Repression der Gene in Glucose-haltigem Medium festzustellen ist, sondern im Gegenteil sogar eine Stimulierung der ACMSI-Aktivität (was sich eventuell mit besseren Wachstumsbedingungen begründen lässt) ist davon auszugehen, dass die acm-Promotoren nicht durch Glucose reprimierbar sind. In komplexen Medien ist ein ähnlicher Verlauf der spezifischen ACMS-Synthetaseaktivität festzustellen. Bis zum Erreichen der stationären Phase steigt die ACMSI-Aktivität an, danach ist ein drastischer Rückgang zu beobachten. Wie bei chemisch definierten Medien ist kein Unterschied zwischen Maltose- und Glucose-haltigen Kulturen festzustellen. Aus den Daten kann geschlossen werden, dass die Promotoren der ACM-Synthetasegene trotz der Präsenz vieler putativer regulatorischer Elemente mit Ähnlichkeit zu Operatoren bzw. putativen Operatoren der Carbon-Katabolit-Repression nicht glucosereprimierbar sind.

4.6.8 Expression des acmA-Gens in S. lividans

Um zu untersuchen, ob die Promotoren der Actinomycinsynthetasen im Unterschied zu S. chrysomallus möglicherweise in S. lividans regulierbar sind, wurden Wachstumskurven von S. lividans TK24/plOacmA aufgenommen. Dies geschah in komplexen Medien mit verschiedenen Kohlenstoffquellen (Maltose/Glucose). Diese Untersuchungen geschahen auch im Hinblick darauf, dass zum Beispiel S. lividans sich im Bezug auf die Regulation der Actinorhodin-Synthese deutlich von S. coelicolor unterscheidet (Romero et al., 1992, Ishizuka et al., 1992)

Abb. 4.6.8-1 zeigt die spezifischen ACMSI-Aktivitäten, die in DEAE-fraktionierten Proteinextrakten von S. *lividans* TK24/plOacmA zu verschiedenen Kultivierungsstadien gemessen wurden. Die spezifischen ACMSI-Aktivitäten in Proteinextrakten aus Mycel aus Glucose- oder Maltose- supplementierten Medien unterscheiden sich in den ersten 48 h der Kultivierung nicht. Während in Proben aus Maltose-gewachsenem Mycel nach etwa 48 h Kultivierung ein Maximum an spezifischer Aktivität erreicht wird und danach ein Rückgang zu verzeichnen ist, findet man bei Glucose-gewachsenen Kulturen noch über diesen Zeitpunkt hinaus eine Zunahme der ACMSI-Aktivität. Eine Repression der acmA-Expression durch Glucose ist nicht festzustellen.



Abbildung: 4.6.8-1 Heterologe Expression des acmA-Genes bei Kultivierung von S. lividans TK24 (plOacmA) in Medium S unter Glucose- oder Maltose- Supplementierung. Gezeigt ist der Verlauf der spezifischen ACMSI-Expression (roter Graph und Kreise unter Glucose-, schwarzer Graph und Quadrate unter Maltose-Supplementierung) und der Biomassen (Feuchtgewichte, dunkle Balken unter Glucose-, helle Balken unter Maltose-Supplementierung.

4.6.9 Vergleich der spezifischen ACMSI-Aktivtäten in S. chrysomallus und S. lividans (plOacmA)

Ein Vergleich der spezifischen ACMSI-Aktivitäten in den DEAE-fraktionierten Proteinextrakten aus dem Actinomycinproduzenten S. chrysomallus SCI und dem heterologen Wirt S. lividans TK24 (plOacmA) zeigte, dass bei der heterologen Expression des acmA-Gens vier- bis sechsfach höhere spezifische Enzymaktivitäten zu erzielen waren (siehe Tabelle 4.6.9-1). Dies lässt sich wahrscheinlich in erster Linie darauf zurückführen, dass im heterologen Wirt S. lividans (plOacmA) das acmA-Gen auf einem in hoher Kopienanzahl vorliegenden Plasmid lokalisiert ist.

Wachstums- dauer [h]	spezifische ACMSI-Aktivität [pkat/mg]								
Stamm 🕨	S. chrysomallus SCI S. lividans TK24								
			(pIC	acmA)					
Medium 🕨	Minima	lmedium	S-Me	edium	S-Medium				
Mit 🕨	Maltose	Glucose	Maltose Glucose		Maltose	Glucose			
18	3,2	5,7							
24			30	56					
28					64	70			
32	7,5	14							
39,5					200	nb			
45,5	0,39	8,7							
46			96	72					
49,5					460	410			
62			59	31					
63,5					389	640			
68,5	0,65	2,5							
73,5			37	30					
90			28	25					
96	2,2	3,8							
108			36	22					
116,5	2,2	7,6							
118			55	18					

Tabelle 4.6.9-1: Spezifische ACMSI-Aktivitäten in DEAE-fraktionierten Proteinextrakten aus S. chrysomallus und S. lividans (plOacmA).

4.6.10 Verwendung des acmA-Promotors zur Expression von rekombinanten NRPS-Genen in S. lividans

Die bei den in den vorangegangenen Paragraphen beschriebenen Untersuchungen festgestellte starke heterologe Expression des auf dem Plasmid plOacmA lokalisierten *acmA*-Gens in *S. lividans* regte dazu an, diesen Promotor auch zur Expression der im Rahmen dieser Arbeit erzeugten rekombinanten NRPS-Gene einzusetzen.

Da es unbekannt war, inwiefern sich Modifikationen im Bereich des Translations-Startcodons des *acm*A-Gens sich auf die Expression unter der Kontrolle des *acm*A-Promotors stehender Gene auswirken würden, sollte der natürliche Übergang zwischen Promotor und Gen dabei nach Möglichkeit unangetastet bleiben. Da die im Rahmen dieser Arbeit erstellten rekombinanten trimodularen NRPS-Gene sich alle in ihrem 5'-Bereich von dem *acm*A-Gen ableiten, konnten diese Gene unter Ausnutzung einer natürlichen EcoRI-Schnittstelle (bp 265 des *acm*A-Gens) an den *acm*A-Promotor fusioniert werden.

4 - Ergebnisse

Das rekombinante NRPS-Gen *acm53*, das im Plasmid pACM53 bereits erfolgreich unter Kontrolle des mel-Promotors exprimiert worden war, wurde unter Ausnutzung der natürlichen *EcoRI-Schnittstelle* im *acmA-Gen* unter Kontrolle des *acmA-Promotors* gestellt. Nach Transformation des resultierenden Plasmides pIOACM53 in *S. lividans* TK64 konnten für *acm53* wesentlich höhere Expressionsraten als unter Kontrolle des mel-Promotors festgestellt werden (Abschnitt 4.3.3). Es wurden daher alle im Folgenden erzeugten rekombinanten NRPS-Gene (*jmlacm1*, *jmlacm2*, *jmlacm5* und *jmlmyx-1*) zur Expression in *S. lividans* unter Kontrolle des *acmA-*Promotors gestellt.



Abbildung 4.6.10-1: Expression von acm53 unter Kontrolle des acmA-Promotors. (A) Aufbau des Expressionskonstruktes plOACM53. (B) Coomassie gefärbtes Polyacrylamidgel von homogenisierten Rohsäften von 4 Kulturen von S. lividans TK64 / plOACM53 (1-4). Als Referenz wurde eine Probe des präparierten pACM53 (siehe auch Abbildung 5.6.6) aufgetragen (Spur R, Pfeil). Man erkennt deutlich die sehr starke Expression von acm53 unter Kontrolle des acmA-Promotors. (C) Autoradiogramm der DC-Analyse eines Kurzzeitfütterungsexperimentes mit S. lividans TK64 / plOACM53 und TK64 / plJ702 (label = 1⁴C-Val).

5 Diskussion

5.1 Stand der Forschung und Zielsetzung

Das zunehmende Auftreten Antibiotika-resistenter pathogener Mikroorganismen (Walsh, 2000) und der Wunsch nach neuen therapeutischen Möglichkeiten zur Behandlung schwer oder gar nicht medikamentös behandelbarer Erkrankungen gibt Anlass zur fortwährenden Suche nach neuen pharmakologischen Wirkstoffen.

Naturstoffe stellen nach wie vor eine wichtige Quelle für neue Arzneimittel dar. Dementsprechend ist das systematische screening von Organismen aus verschiedensten Habitaten nach bislang unbekannten Naturstoffen mit Potential pharmakologischem ein wichtiger Bestandteil der modernen Wirkstoffforschung. Es ist jedoch davon auszugehen, dass die Anzahl von pharmakologisch nutzbaren Naturstoffen nicht unendlich ist, was sich auch in der beständig steigenden Wiederfindungsrate bereits zuvor identifizierter Verbindungen wiederspiegelt. Bei der Kultivierung von Actinomyceten aus Bodenproben und anschließendem screening nach Metaboliten mit antibiotischer Aktivität lag z.B. die Wiederfindungsrate bereits bekannter Antibiotika schon im Jahre 1998 bei 99% (Handelsman et al., 1998). Unter dem Eindruck dieser hohen Wiederfindungsraten bei der Untersuchung kultivierbarer Mikroorganismen bemüht man sich zunehmend um die Untersuchung von Biosynthesesystemen unkultivierbarer Mikroorganismen (Handelsmann, 1995; Ginolhac et al., 2004; Treusch und Schleper, 2005).

Eine Alternative zur zunehmend aufwendigen Suche nach neuen Naturstoffen stellt die Entwicklung neuer Verbindungen auf Grundlage der bekannten Naturstoffe dar. Die chemische Modifizierung von pharmakologisch relevanten Naturstoffen ist eine seit langem gängige Praxis. Mit der Entwicklung moderner gentechnischer Methoden und der durch ihre Anwendung gewonnene Kenntnis zahlreicher Naturstoff-Biosynthesegene eröffnete sich jedoch der Naturstoffforschung eine weitere Möglichkeit, neue Substanzen auf Naturstoff-Basis zu generieren: Die gezielte Modifikation von Naturstoff-Biosynthesesystemen mit dem Ziel, diese zur Produktion "künstlicher Naturstoffe" (unnatural natural compounds, McDaniel et al., 1999) umzuprogrammieren.

Bei der Entwicklung solcher unnatürlicher Naturstoffe kommt den durch Polyketidsynthasen des Typs I und durch nichtribosomale Peptidsynthetasen gebildeten Substanzen eine besondere Stellung zu, da die Biosynthesesysteme dieser Verbindungen einen modularen Aufbau aufweisen. Die wohlverstandene Beziehung zwischen der Abfolge der konstituierenden Domänen der NRPS- und PKS- Biosynthesesysteme und der Struktur der gebildeten Naturstoffe inspirierte Versuche, durch rational geplante Modifikationen an den Biosynthesesystemen gezielte Veränderungen in die jeweiligen Zielstrukturen einzubringen.

Erstmalig demonstriert wurde dies durch die Deletion der KR-Domäne des fünften Modules der Erythromycin-PKS; das derartig modifizierte Enzymsystem produzierte wie anhand der neu generierten Domänenarchitektur vorhergesagt - ein 5-Keto-Produkt anstelle der vom Wildtypenzymsystem synthetisierten 5-Hydroxy-Verbindung (Donadio *et al.*, 1991). Ein vom natürlichen Produktmolekül 6-Deoxyerythronolid B (DEBS) strukturell stärker abweichendes Produkt konnte durch eine Fusionierung innerhalb der PKS des Erythromycin-Biosynthesegenclusters erzielt werden: Durch Fusionierung der carboxyterminalen Te-Domäne der DEBS 3 hinter die DEBS 1 wurde eine rekombinante PKS erhalten, die *in vitro* die Bildung eines Triketid-Laktones katalysierte (Cortes *et al.*, 1995, Piper *et al.*, 1995). Olynyk *et al.* konnten 1996 den erfolgreichen Austausch einer für Methylmalonat spezifischen AT-Domänengruppe in der DEBS1 gegen eine für Malonat spezifische AT-Gruppe aus der Rapamycin PKS zeigen.

Auf dem Gebiet der rekombinanten Peptidsynthetasen gelang eine Umprogrammierung des Surfactin-Biosynthesesystems aus *B. subtilis* durch den Austausch der A- und T-Domäne aus dem Leu-Modul von SrfA-C durch A-T-Domänen aus verschiedenen NRPS-Clustern (Stachelhaus *et al.*, 1995). Verkürzte Derivate des Surfactins wurden durch rekombinante Derivate der Surfactin-Synthetasen produziert, in denen de Ferra *et al.* (1997) die terminale Thioesterasedomäne von SrfA-C hinter Module von SrfA-B fusioniert hatten.

Die oben genannten Pionierarbeiten auf dem Gebiet rekombinanter Peptidsynthetasen wurden alle an NRPS-Systemen aus Bacillus spp. durchgeführt. Da den Actinomyceten, speziell den Streptomyceten, als Produzenten pharmakologisch relevanter Naturstoffe wesentlich größere Bedeutung zukommt, sollte mit der hier vorliegenden Arbeit ein Beitrag ΖU Konstruktion rekombinanten von Peptidsynthetasen, ausgehend von NRPS-Systemen aus Streptomyceten, geleistet werden.

5.2 Rekombinante Peptidsynthetasen auf Grundlage der Actinomycin-Synthetasen aus Streptomyces chrysomallus

Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass sich durch Rekombination von NRPS-Genen aus Streptomyces chrysomallus und anschließende heterologe Expression der resultierenden Hybridgene in S. lividans rekombinante Peptidsynthetasen mit veränderter Produktspezifität erzeugen lassen. Dies konnte auch unter Einbringung von Genfragmenten aus NRPS-Genclustern aus Bacillus spp. gezeigt werden. Ein zumindest partiell funktionsfähiges NRPS-PKS-Hybrid konnte ebenfalls erzeugt werden. Es wurden katalytisch aktive Peptidsynthetasen nach Fusionen zwischen C-A, A-T, T-C T-Te-Domänen erhalten, wodurch gezeigt werden konnte, dass das und Actinomycin-Biosynthesegencluster aus dem Actinomyceten S. chrysomallus für eine genetische Re-Programmierung in vergleichbarem Umfang empfänglich ist wie die zur rekombinanter NRPS Erzeugung zumeist herangezogenen Peptidsynthetasesysteme aus Bacillus spp..

Obwohl katalytisch aktive rekombinante Peptidsynthetasen prinzipiell durch Fusionen in verschiedenen Inter-Domänen-Übergangsbereichen erhalten werden konnten, erwiesen sich nicht alle der hier untersuchten Fusionspunkte als gleich gut für die Erzeugung von rekombinanten Peptidsynthetasen geeignet. Die Auswirkungen der verschiedenen Fusionierungsstrategien auf die Funktionsfähigkeit der resultierenden Konstrukte sind nicht nur für die weitere Erzeugung rekombinanter NRPS von Interesse, es lassen sich auch Rückschlüsse auf die Beziehungen und Wechselwirkungen der fusionierten NRPS-Domänen ziehen.

5.3 Konstrukte mit fusionierten Te-Domänen

Es wurden verschiedene rekombinante bimodulare Derivate der Actinomycinsynthetasen erstellt, in welche die Thioesterasedomänen von ACMSIII, Tycc und SrfAC eingebracht wurden. Von den Konstrukten, die unter Verwendung eines zwischen T- und Te- Domäne gelegenen Fusionspunktes erstellt worden waren, erwiesen sich nur diejenigen mit der Te-Domäne von TycC als zur Produktfreisetzung befähigt. Die Te-Domäne der ACMSIII war nach Fusionierung T-Teim Übergangsbereich inaktiv. Wurde sie hingegen zusammen mit den ihr voranstehenden Domänen als eine Einheit in rekombinante Konstrukte eingebracht (also ohne Fusionspunkt zwischen T- und Te-Domäne), so war sie ebenfalls zur Produktabspaltung befähigt. Es konnte gezeigt werden, dass der nicht konservative Austausch von zwei Aminosäuren am Fusionspunkt (bedingt durch die in die kodierenden Gene künstlich eingebrachte Fusionsschnittstelle) ausreichend war, um die fusionierte ACMSIII-Te inaktiv zu machen. Der Aminosäureaustausch am Fusionspunkt zwischen T- und Te-Domäne ist, bezogen auf die Sequenz von ACMSII und ACMSIII, nicht konservativ, jedoch konservativ im Hinblick auf die Sequenz von TycC (DF->EF). Der Umstand, dass die Te-Domäne von TycC hinter dem Fusionspunkt aktiv ist, lässt eventuell darauf schließen, dass den Aminosäuren am Fusionspunkt eine besondere Bedeutung bei der Packung der Te-Domänen zukommt. Da alle erzeugten Te-Testkonstrukte zur Selbstbeladung mit ihren Aminosäuresubstraten und zur Bildung des enzymgebundenen Peptides befähigt waren, kann eine besondere Auswirkung der Sequenzänderung am Fusionspunkt auf die jeweiligen T-Domänen ausgeschlossen werden.

Der hier verwendete Fusionspunkt ("EcoRI-Fusionspunkt", 34 AS hinter dem konservierten Serin-Rest des 4'-PPant-Bindungsmotives) wurde anhand eines Alignments von zahlreichen NRPS-Modulen gewählt; es wurde dabei angenommen, dass er am Anfang eines hochvariablen Übergangsbereiches zwischen der T- und der Te-Domäne liegen würde. Daten von Weber *et al.* (2002) über die räumliche Struktur von T-Domänen zeigen jedoch, dass die beiden Aminosäuren, welche durch das Einbringen der Fusionsschnittstelle in die zu fusionierenden Gene verändert wurden, noch in den Bereich der vierten Helix der T-Domäne fallen. Eventuell lässt sich die negative Auswirkung, die ein nicht-aminosäurekonservativer Austausch am Fusionspunkt auf die nachfolgend fusionierte Te-Domäne hat, mit einer Störung dieser Helix begründen. Schwarzer *et al.* (2001) haben einen Fusionspunkt unmittelbar hinter der vierten Helix genutzt (38 AS hinter dem konservierten Serin-Rest des 4'-PPant-Bindungsmotives), um Te-Domänen verschiedenster Herkunft hinter die T-Domäne des Pro-Moduls von TycB zu fusionieren.

Die Annahme, dass sich zwischen dem Ende einer T-Domäne und dem Beginn einer nachfolgenden Te-Domäne ein hochflexibler und gegenüber Manipulationen ausgesprochen toleranter Übergangsbereich befindet, wird durch Ergebnisse von Joshi *et al.* (2005) unterstützt. Diese hatten gezeigt, dass die Fettsäuresynthase der Ratte auch nach einer Deletierung des halben T-Te-Übergangsbereiches noch über etwa 50% der natürlichen Thioesteraseaktivität verfügt. Bei diesen Deletierungen war jedoch der Bereich der letzten Helix der T-Domäne unangetastet belassen worden.

De Ferra et al. (1997) beschreiben Fusionskonstrukte, in denen die Te-srf unter Ausnutzung eines weit innerhalb der T-Domäne gelegenen Fusionspunktes (13 und 14 AS hinter dem konservierten Ser-Rest) versetzt worden war. Dabei war die Fusionsschnittstelle so gewählt worden, dass sie sich *silent* in die Spendergene einbringen ließ. Deshalb ist zu schließen, dass möglicherweise die Packung der Te-Domänen in den bezüglich der Produktfreisetzung inaktiven Konstrukten in Mitleidenschaft gezogen wurde.

Erstaunlich ist, dass der Aminosäureaustausch am Fusionspunkt die Interaktion zwischen T- und E-Domäne im D-Valin-Modul der ACMSII nicht aufhob. Es kann daher vermutet werden, dass die Aminosäuren am Fusionspunkt für die Packung der E-Domäne und für die T-/E-Interaktion – anders als für die Packung der Te-Domäne und die T-/Te-Interaktion - eine nur untergeordnete Rolle spielen. Dies würde im Einklang damit stehen, dass sich T-Domänen, die Epimerasedomänen voranstehen, schon in der Primärstruktur deutlich von anderen T-Domänen unterscheiden (Linne *et al.*, 2001).

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Konstrukte mit fusionierten Te-Domänen setzten lineare Aroyl-Dipeptide frei. Dies ist bemerkenswert, da diese Te-Domänen normalerweise cyclische Verbindungen freisetzen. Bei einem Großteil der an NRPS und PKS gebildeten Verbindungen handelt es sich um Makrocyclen. Für mehrere Systeme konnte gezeigt werden, dass sich die Cyclisierung an der Te-Domäne vollzieht, so z.B. beim Enterobactin (Shaw-Reid et al., 1999). Trauger *et al.* (2000) haben gezeigt, dass die separat exprimierte Te-Domäne der TycC in der Lage ist, Peptidyl-Thioester zu spalten und deren Peptidanteil in cyclische und lineare Produkte zu überführen. Dabei wurden dem natürlichen Decapeptidyl-Substrat ähnliche Verbindungen der Anteil an linearem Spaltungsprodukt zunahm. Die sowohl hier als auch in anderen Arbeiten (de Ferra *et al.* 1997, Schwarzer *et al.*, 2001) gefundene Abspaltung von stark verkürzten Peptid-Produkten in linearer Form passt zu diesem Befund.

Es wird angenommen, dass die Thioester-Spaltung an einer Te-Domäne durch zwei aufeinanderfolgende Transacylierungen erfolgt, wobei die Acylverbindung zunächst vom 4'-PPant-Arm des letzten Modules auf eine Seryl-Seitenkette der Te-Domäne und sodann auf ein freies (d.h. nicht zum Enzym gehörendes) Nucleophil übertragen wird. Lineare Produkte entstehen, wenn im zweiten Schritt Wasser als Nucleophil fungiert, wohingegen cyclische Produkte resultieren, wenn das Nucleophil Teil des Acyl-Substrates ist. Bei der Bestimmung der räumlichen Struktur der DEBS-Te (Tsai *et al.*, 2001) wurde ein hydrophober Kanal gefunden, den das Substrat wahrscheinlich passieren muß, um in das reaktive Zentrum der Domäne zu gelangen. Ein solcher Kanal wäre geeignet, Wasser vom intermediären Seryl-Ester fernzuhalten und eine intramolekulare Transacylierung zu begünstigen.

Dementsprechend muß man die von rekombinanten NRPS durch normalerweise cyclisierende Te-Domänen abgespaltenenen linearen Verbindungen als Produkt einer unspezifischen Nebenreaktion ansehen, die aufgrund einer Inkompatibilität des Substrates mit den abspaltenden Te-Domänen zur Hauptreaktion wird.

5.4 Fusionen am und im Initiationsmodul der Actinomycinsynthetasen (A-T-Fusionen, T-C-Fusionen)

Viele Aroyl-Peptidlakton-synthetisierende NRPS-Systeme zeichnen sich dadurch aus, dass die Aktivierung der Aryl-Carbonsäure, welche den formalen Aminoterminus der Peptidkette bildet, an einer separaten A-Domäne erfolgt. Die T-Domäne, welche den kanonischen Domänensatz eines Initiationsmodules vervollständigt, wird entweder ebenfalls als alleinstehende Domäne gefunden oder ist an die nachfolgende modulare Peptidsynthetase kondensiert (Keller und Schauwecker, 2001). Im Falle des Actinomycin-NRPS-Systems liegen sowohl die A-Domäne (ACMSI) die T-Domäne (AcmACP) Arylcarbonsäure-aktivierenden als auch des Initiationsmodules als alleinstehende Domänen vor. Es ist vorstellbar, dass sich die modularen NRPS-Systeme durch Genfusionen und nachfolgende Genduplikationen aus solchen Ein-Domänen-Enzymen entwickelt haben. Vor diesem Hintergrund wurde hier eine künstliche Fusionierung von acmA- und acmD-Gen durchgeführt. Es zeigte sich, dass das resultierende Didomänen-Enzym in der Lage war, in vitro die Funktion von ACMSI + AcmACP zu übernehmen.

Eine natürliche Didomänen-NRPS mit Spezifität für Aryl-Carbonsäuren wird z.B. im Microcystin-Biosynthesegencluster von Microcystis aeruginosa durch mcyG kodiert. Das N-terminale NRPS-Initiationsmodul (mit Spezifität für Benzoesäure) von McyG dient als Loader-Modul für die nachfolgende PKS-/NRPS-assembly line, wobei sich auf McyG noch ein komplettes PKS-Modul an den NRPS-Loader anschließt (Tillett et al., 2000). Eine vergleichbare Situation findet man auch bei der Rifamycin-Biosynthese von Amycolatopsis mediterranei, hier wird 3-Amino-5-Hydroxy-Benzoesäure durch ein NRPS-Initiationsmodul zur Kettenverlängerung durch 10 nachfolgende PKS-Module (von denen sich drei carboxyterminal des NRPS-Loadermoduls auf RifA befinden) bereitgestellt (Admiraal et al., 2001). Die Modulanordnungen auf MycG und RifA (siehe Abb. 5.4.1) gaben Anlass Versuch, eine entsprechende zum

Modulkonfiguration auch in rekombinanten Derivaten des Actinomycin-NRPS-Systems zu etablieren. Ein durch entsprechende Genfusion (*acmA+acmD+acmB*) gewonnenes rekombinantes NRPS-Gen kodierte für eine Peptidsynthetase (ACM45), die zur eigenständigen Synthese (d.h. in Abwesenheit von ACMSI und AcmACP) von Aroyl-Thr-Val befähigt war. Dies zeigt, dass die im Actinomycin-Biosynthesesystem vorgefundene Separierung der Domänen des Initiationsmodules für ihre Funktionsfähigkeit nicht unabdingbar ist. Eventuell wurden ACMSI und AcmACP während der Evolution des ACM-Biosynthesegenclusters aus einem anderen Kontext requiriert.



Abb. 5.4.1.: Aryl-Carbonsäure-aktivierende Initiationsmodule verschiedener NRPS- bzw. PKS-Biosynthesesysteme. Gezeigt sind die Domänen der Loader-Module (gelb hinterlegt, jeweils mit dem an der T-Domäne gebundenen Substrat dargestellt) und die Elongationsmodule des ersten modularen Enzyms des pathways (grau hinterlegt).

In der Literatur sind auch NRPS-A/T-Domänen beschrieben, die nicht Teil einer NRPSassembly line sind, sondern vielmehr Teil eines Multienzym-Systems zur Modifizierung von aromatischen Aminosäuren sind, so z.B. NovH aus dem Novobiocin-Biosynthesegencluster von Streptomyces spheroides (Chen und Walsh, 2001) und CloH Clorobiocin-Biosynthesegencluster Streptomyces aus dem von roseochromogenes (Pojer et al., 2002). Es wäre denkbar, dass die Domänen der Aryl-Carbonsöure-aktivierenden Initiationsmodule der Arylpeptidlaktonsynthetasen aus ähnlichen modifizierenden Systemen hervorgegangen sind. Kürzlich konnte sogar die Beteiligung eines Fettsäuresynthase-ACPs an der nichtribosomalen Synthese eines Peptides nachgewiesen werden (Schmoock et al., 2005). Bezeichnenderweise bindet das betreffende FAS-ACP 2-Chinoxalinsäure, den formalen Aminoterminus von Triostin A. Das restliche Triostin-NRPS-Biosynthesesystem aus S. triostinicus hat hohe Ähnlichkeit zu dem Actinomycin-Biosynthesesystem. Eventuell kann dieses Ergebnis als weiterer Hinweis darauf gedeutet werden, dass die in Actinomycin-NRPS-System bestehende Fragmentierung des Initiationsmoduls das Resultat einer erst unlängst erfolgten Gewinnung dieser Enzyme für die nichtribosomale Peptidsynthese des Actinomycins ist.

Das Fusionskonstrukt ACM45 wurde durch direkte Fusionierung der für ACMSI, AcmACP und ACMSII kodierenden Gene erzeugt. Es wurden keine künstlichen linker-Sequenzen eingebracht. Dies ist im Hinblick auf mögliche Mechanismen der Erkennung und Interaktion zwischen diesen im natürlichen Kontext separierten Proteinen interessant.

Bei nicht kovalent verbundenen PKS-Modulen wurden kurze, N- und C-terminal gelegene Peptidabschnitte identifiziert, die offenbar die Kommunikation der auf verschiedenen Proteinen gelegenen Module unterstützen (Gokhale *et al.*, 1999, Tsuji *et al.*, 2001). Nach Hahn und Stachelhaus (2004) wird die erfolgreiche und selektive Interaktion zwischen den konstituierenden Synthetasen einer NRPS-assembly line ebenfalls durch kurze Kommunikationsdomänen (COM-Domänen) an den Enden der Einzelenzyme vermittelt. Für carboxyterminal gelegene E-Domänen aus *Bacillus*-NRPS geben die Autoren die Länge dieser Kommunikationsdomänen mit 20 bis 30 AS an. Die an ACMSI_FUS001 vorgenommene Fusionierung führt zu einem Initiationsmodul, in dem die Abstände zwischen den hochkonservierten Sequenzmotiven der A-Domäne und der T-Domäne denen in durchschnittlichen NRPS-Modulen entsprechen. Ebenso

führt die Fusionierung dieses Loader-Moduls an die ACMSII zu einer trimodularen

114

Peptidsynthetase mit völlig unauffälligen Inter-Modul-Abständen, wohingegen man erwarten sollte, dass sich die Anwesenheit zusätzlicher COM-Domänen an den Amino- bzw. Caboxy-Termini der Proteine ACMSI, AcmACP und ACMSII in Fusionskonstrukten mit deutlich verlängerten *linker*-Bereichen äußert.

Da bei der Fusionierung auf das Einbringen zusätzlicher linker-Bereiche verzichtet wurde, ist davon auszugehen, dass die Sequenzabschnitte zu beiden Seiten der Fusionspunkte gegenüber der Wildtypsituation an Bewegungsfreiheit eingebüßt haben. Es ist anzunehmen, dass die Interaktion von hypothetischen COM-Domänen in diesen Bereichen dadurch beeinträchtigt würde. Da die Fusionskonstrukte dennoch katalytisch aktiv waren, kann vermutet werden, dass die Interaktion des AcmACP mit der ACMSI einerseits und dem Thr-Modul der ACMSII andererseits nicht ausschließlich durch die wechselseitige Erkennung der Enzymenden vermittelt wird. Durch in silico-Analyse der Interaktion von Fettsäure ACP und ß-Ketoacyl-ACP-Synthase III wurde festgestellt, dass die Interaktion dieser beiden Proteine maßgeblich an der Helix 2 des Acyl-Carrier-Proteins erfolgt (Zhang et al., 2001). Neuere Untersuchungen an ACP-Domänen von modularen Polyketidsynthasen unterstützen diesen Befund (Weissman et al., 2006). Für die T-Domäne von EntB, die wie das AcmACP als Aryl-Carrier fungiert, wurde gefunden, dass die zur Interaktion mit der nachfolgenden Peptidsynthetase EntF wichtigen Aminosäurereste in den Helices 2 und 3 situiert sind (Lai et al., 2006). Wenn man annimmt, dass die Erkennung des AcmACPS durch ACMSI bzw. ACMSII ebenfalls in diesem Bereich geschieht, so erscheint es plausibel, dass die Wechselwirkung zwischen den Enzymen auch nach Fusionierung der Proteinenden noch zustande kommen kann.

5.5 Zusammenführung von Initiations-, Elongations- und Terminationsmodulen auf einer Peptidsynthetase

Die rekombinante Polyketidsynthase DEBS1+TE (Cortes et al., 1995, Piper et al., 1995) war nach heterologer Expression ihres kodierenden Gens in *S. chrysomallus* zur *in vivo*-Produktion ihres Hydroxyhexanonsäurelakton-Produktes befähigt. Dies ist darauf zurückzuführen, dass durch die Fusionierung der Te-Domäne der DEBS3 an die DEBS1 eine Polyketidsynthase entstanden war, welche sowohl über die Fähigkeit zur Initiation als auch zur Termination der Produktsynthese verfügte.

Durch die kombinierte Anwendung der in den vorangegangenen Abschnitten diskutierten Strategien zur Erstellung von rekombinanten ACMSII-Derivaten mit Initiations- bzw. Terminationsfunktion wurden zwei ACM-Hybride der Domänenanordnung ACMSI(A)-AcmACP(T)-ACMSII(C1A1T1C2)-ACMSIII(A3M3T3Te) (=ACM53) bzw. [ACMSI(A)-AcmACP(T)-ACMSII(C1A1)-ACMSIII(T2C3A3M3T3Te) (=JMLACM5) erstellt, die – wie die PKS DEBS1+TE – alle zur Initiation und Termination der Produktbildung benötigten Funktionen auf jeweils einem Enzym vereinten. Die experimentellen Daten zeigen, dass diese Konstrukte die Befähigung zur eigenständigen (also von anderen Enzymen der Actinomycin-assembly-line unabhängigen) Produktion von Aroyl-Thr-MeVal haben. Es konnte gezeigt werden, dass entsprechende *S. lividans*-Transformanten durch die Expression der kodierenden Gene acm53 bzw. *jmlacm5* zur *in vivo*-Produktion von Aroyl-Thr-MeVal befähigt werden.

Die Möglichkeit zur in vivo-Produktion wurde hier genutzt, um die durch die beiden ACMS-Hybride ACM53 und JMLACM5 gebildeten Produktspektren zu vergleichen. Hauptaugenmerk ruhte dabei auf der N-Methylierung der Produktmoleküle. Da der von NRPS-N-Methyltransferasedomänen genutzte Methyldonor AdoMet unter Bedingungen der *in-vitro*-Inkubation instabil ist, wurde die *in vivo*-Produktbildung in Kurzzeit-Fütterungsexperimenten als besonders geeignet für diese Untersuchungen angesehen.

Bei dem Vergleich von JMLACM5 [ACMSI(A)-AcmACP(T)-ACMSII(C₁A₁)-ACMSIII(T₂C₃A₃M₃T₃Te) und ACM53 [ACMSI(A)-AcmACP(T)-ACMSII(C₁A1T₁C₂)-ACMSIII(A₃M₃T₃Te)] wurde gefunden, dass das Konstrukt, das über eine C-Domäne aus einem N-Methyl-Valin-Modul verfügt, deutlich weniger unmethyliertes Produkt bildet als das Vergleichskonstrukt, dessen zweite C-Domäne aus dem D-Valin-Modul der ACMSII stammt.

Es ist bekannt, dass C-Domänen eine Selektivität hinsichtlich des stromab angebotenen monomeren Bausteines besitzen. Der hier gefundene Unterschied im Methylierungsgrad des Produktes kann als Hinweis darauf gedeutet werden, dass sich diese Selektivität auch auf den Methylierungszustand der Substrataminosäure erstreckt.

5.6 A-T-Fusionierung zum Erstellen eines rekombinanten NRPS/PKS-Hybridenzyms

Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen, dass sich durch Fusionierungen in den Übergangsbereichen zwischen Domänen funktionell aktive rekombinante Derivate der Actinomycinsynthetasen erzeugen lassen. Als besonders geeignet hatte sich dabei die Fusionierung zwischen A- und T-Domänen erwiesen. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit Untersuchungen an A-T-Fusionierungen an Bacillus-NRPS (Doekel und Marahiel, 2000).

Es konnte hier auch gezeigt werden, dass geringfügige Sequenzänderungen im A-T-Linkerbereich keine negativen Auswirkungen auf die Fähigkeit eines Modules zu Selbstbeladung mit dem an der A-Domäne erkannten Substrat haben (Vergleich der Selbstbeladung JMLACM2 / ACMSII). Bei Untersuchungen an dem NRPS-PKS-Mischkonstrukt JMLMyx-1 konnte nachgewiesen werden, dass auch bei Fusionierungen innerhalb von sehr inhomogenen A-T-Übergangsbereichen eine Beladung der fremden T-Domäne durch die A-Domäne vor dem Fusionspunkt stattfinden kann.

Zunächst unerwartet war, dass das an JMLMyx-1 auflaufende Aroyl-Threonin nicht von den stromab der T-Domäne gelegenen PKS-Domänen als Substrat akzeptiert wurde. Allerdings werden bei der Untersuchung von PKS-Fusionskonstrukten häufig inaktive rekombinante Synthasen gefunden. Schlüssige rationale Modelle zur Vorhersage oder Korrektur dieses Problems sind noch nicht entwickelt worden, eventuell ist die Entwicklung solcher Modelle aufgrund des sehr komplexen Sachverhaltes auch in näherer Zukunft nicht zu erwarten (Chandran *et al.*, 2006).

Insgesamt zeigen die bei der Untersuchung der rekombinanten Peptidsynthetasen erhaltenen Daten, dass funktionsfähige Hybridenzyme aus den Actinomycinsynthetasen (auch unter Einbeziehung fremder Domänen und Module) durch Fusionen in verschiedenen Interdomänen-Übergangsbereichen erzeugt werden können. Dabei wurden jedoch nicht ausschließlich voll funktionsfähige Konstrukte erhalten.

Wenn rekombinante Peptidsynthetasen unter geeigneten Inkubationsbedingungen nicht alle katalytischen Aktivitäten entwickeln, die man aufgrund ihrer Domänenanordnung erwarten sollte, so kann man vorrangig zwei Ursachen dafür annehmen:

- Die Wahl eines Fusionspunktes, der sich nachteilig auf die Struktur der zu beiden Seiten des linker-Bereiches befindlichen Domänen auswirkt.
- 2. Eine Inkompatibilität von Domänen des Fusionskonstruktes mit Substraten, mit denen sie in der jeweiligen Wildtypsituation nicht konfrontiert werden.

Um das Risiko, inkompatible Teilstrukturen zu fusionieren, zu minimieren, wurden die hier untersuchten rekombinanten Peptidsynthetasen durch Fusionierung außerhalb der hochkonservierten Sequenzmotive der Domänen erzeugt (allerdings sind auch die zur Fusionierung benutzten *linker*-Bereiche z.T. konserviert, vgl. Abb. 4.4-1). In der Literatur sind auch Fusionskonstrukte beschrieben, die durch Fusionierung innerhalb von hochkonservierten Sequenzmotiven erzeugt wurden (Yakimov *et al.*, 1999), jedoch wurde dies bislang nur mit zueinander hochgradig ähnlichen Domänen gezeigt.

Die bei der Untersuchung der Thioesterase-Testkonstrukte erhaltenen Daten lassen interpretieren, über die sich dahingehend dass auch Interdomänen-Übergangsbereiche hinweg komplizierte und schwer vorhersagbare Interaktionen zwischen benachbarten Domänen bestehen können. Eventuell wird man zumindest solange keine 3D-Strukturen von kompletten multimodularen Peptidsynthetasen vorliegen – auch weiterhin darauf angewiesen sein, geeignete Fusionspunkte zwischen NRPS-Systemen von Fall zu Fall empirisch zu ermitteln.

Der Befund, dass an dem hier vorgestellten NRPS-PKS-Hybridenzym zwar ein Aroyl-Peptid gebildet, jedoch von dem nachfolgenden PKS-Modul offenbar nicht weiter prozessiert wurde, kann eventuell auf eine Unverträglichkeit der PKS-Domänen mit dem auf der vorangehenden (kognaten) T-Domäne aufgelaufenen (fremden) Aroyl-Peptid zurückgeführt werden. Die NRPS-Module, die in der Myxothiazol-assembly line auf MtaC und MtaD situiert sind und dem hier fusionierten PKS-Modul von MtaD im natürlichen Kontext voranstehen, bringen jeweils eine Thiazol-Struktur in das Produkt ein, so dass das PKS-Modul von MtaD im natürlichen Kontext ein Zwischenprodukt prozessiert, das sehr viel hydrophober ist Aryol-Threonin. Möglicherweise ist die ausbleibende Weiterprozessierung des am Enzym auflaufenden Aroyl-Thronins durch das PKS-Modul durch diesen Unterschied in den Hydrophobizitäten der Intermediate begründet.

5.7 Untersuchungen an den acm-Promotoren

Coque et al. (1996) konnten das Gen der ACV-Synthetase aus dem Actinomyceten Nocarida lactamdurans in effektiver Weise unter Kontrolle des eigenen Promotors in S. lividans heterolog exprimieren. Dies inspirierte dazu, die Expression der Actinomycinsynthetasegene (oder von ihnen abgeleiteter rekombinanter NRPS-Gene) aus S. chrysomallus im heterologen Wirt S. lividans ebenfalls unter Kontrolle der

eigenen Promotoren vorzunehmen. Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass der acm-Promotorbereich auch im heterologen Wirt S. lividans die Expression der unter seiner Kontrolle stehenden Peptidsynthetasegene antreibt. Da es sich dabei schon im Rahmen der ersten Vorversuche abzeichnete, dass die heterologe Expression des acmA-Gens wesentlich stärker erfolgt als die heterologe Expression des acmB-Gens, wurde im Folgenden das Augenmerk vor allem auf die acmA-Seite des divergenten acm-Promotorbereiches gerichtet. Um optimale Bedingungen für die geplante heterologe Expression von rekombinanten NRPS-Genen unter der Kontrolle des acmA-Promotors etablieren zu können, wurde die Expression des acmA-Gens sowohl in S. chrysomallus als auch in S. lividans-Transformanten untersucht. Dabei wurde gefunden, dass die maximale ACMSI-Aktivität noch während der exponentiellen Wachtumsphase auftritt. Dies war unerwartet, da die Antibiotika-Biosynthese in Streptomyces-Flüssigkulturen generell als ein Ereignis der spätexponentiellen und stationären Phase beschrieben wird (Bibb, 2005). Der zeitliche Verlauf der erreichten Actinomycin-Titer in S. chrysomallus entsprach auch diesem Bild; ein großer Teil der Actinomycinsynthese fand erst nach Stagnation des Wachstums statt. Die für S. S. antibioticus und parvulus beschriebene Glucose-Repression der Actinomycinsynthese konnte auch für S. chrysomallus gezeigt werden; für die Expression der Actinomycinsynthetasegene konnte jedoch keine Glucose-Repression festgestellt werden. Diese Befunde lassen sich dahingehend interpretieren, dass die Regulation der Actinomycin-Biosynthese in S. chrysomallus nicht auf der Ebene der Regulation der Genexpression der Peptidsynthetasegene erfolgt.

Die Inspektion der in *primer-extension-*Experimenten bestimmten Transkriptionsstartpunkte der acm-Promotoren ergab, dass die im acm-Promotorbereich befindlichen Promotoren der Gruppe der Streptomyces-Promotoren mit Homologie zu σ^{70} -abhängigen Promotoren von *E. coli* zuzuordnen sind. Weiterhin wurde eine Ähnlichkeit der acm-Promotoren zum veg-Promotor aus *Bacillus subtilis* gefunden.

Somit zeigen die acm-Promotoren Ähnlichkeit zu vegetativen Promotoren, was mit dem Befund, dass die maximalen Enzymaktivitäten ihrer Genprodukte in der exponentiellen Wachstumsphase auftreten, im Einklang steht.

Promotoren mit Ähnlichkeit zu σ^{70} -abhängigen Promotoren von E. coli aus Streptomyces sind bekannt, die Häufigkeit ihres Auftretens in Streptomyces wurde mit etwa 15% der bekannten Promotorsequenzen angegeben (Strohl, 1992). Im Genom des Modellorganismus Streptomyces coelicolor wurden 63 Gene, die für Mitglieder

der σ^{70} -Familie kodieren, gefunden (Paget und Hellman, 2003). Ein Vergleich der –10 und -35 - Regionen, die für die drei acm-Promotoren gefunden wurden, mit den -10 und -35 -Regionen von bekannten Streptomyceten-Promotoren mit Homologie zu σ^{70} -abhängigen Promotoren zeigte, dass die acm-Promotoren Homologie zu den Maltose-Aufnahmesysteme Promotoren der verschiedener Streptomyceten aufweisen. Weiterhin wurde hohe Ähnlichkeit zu Promotoren von Amylase-Genen gefunden. Somit zeigten die acm-Promotoren höchste Ähnlichkeit zu klassischen Carbon-Katabolit-repremierten Promotoren. Außerdem wurden im intercistronischen Bereich zwischen den Actinomycin-NRPS-Genen mehrere Sequenzmotive mit Ähnlichkeit zum CcpA-Bindungsmotiv amyO (Bacillus subtilis, Weickert und Chambliss, 1990) bzw. zum Operator des MalR-Repressors aus Streptomyces lividans (Nguyen et al., 1997) gefunden. Da jedoch bei der Aufzeichnung der Wachstumskurven von S. chrysomallus und von S. lividans-Transformanten keine Glucose-Repression der Expression von acmA oder acmB festgestellt werden konnte, muß davon ausgegangen werden, dass die im acm-Promotorbereich gefundenen putativen Operatormotive in S. chrysomallus nicht als Bindungsstellen eines Carbon-Katabolit-repressionsvermittelnden Proteins dienen.

Actinomycin wird von vielen Streptomyces-Stämmen produziert. Eventuell kann man dies als einen Hinweis auf eine Vererbung des Actinomycin-Biosynthesegenclusters durch horizontalen Gentransfer werten. Für das ebenfalls in Freilandisolaten häufig angetroffene Streptomycin-Gencluster wurde eine entsprechende Theorie durch umfangreiche Hybridisierungsexperimente untermauert (Egan et al., 1998). Das Actinomycin-Biosynthesegencluster aus S. chrysomallus wird von Sequenzen flankiert, die als mobile genetische Elemente eingeordnet werden können (Keller, Lang, Pfennig, Schauwecker, Veröffentlichung in Vorbereitung). Dies kann als ein Hinweis auf eine Vererbung des ACM-Genclusters durch horizontalen Gentransfer gedeutet werden. Vor diesem Hintergrund kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Regulation der Actinomycinsynthese und der Genexpression der NRPS-Gene in einem hypothetischen Spenderstamm oder z.B. in S. antibioticus anders erfolgt als in S. chrysomallus. Möglicherweise sind die transaktiven Steuerelemente in S. chrysomallus nicht vorhanden. Die Anwesenheit der putativen Operator-Motive der Carbon-Katabolitrepression im acm-Promotorbereich kann eventuell auf einen ancestralen Regulationsmechanismus hinweisen.

Der acmA-Promotor hatte sich bei der heterologen Expression des acmA-Gens in S. lividans als sehr leistungsfähig erwiesen. Er wurde daher auch zur heterologen Expression von rekombinanten NRPS-Konstrukten eingesetzt, deren 5'-Ende sich vom acmA-Gen ableitete. Dabei wurde der natürliche Übergang vom Promotorbereich zum Gen unverändert gelassen.

Obwohl damit ein sehr leistungsstarkes Expressionssystem für rekombinante Derivate der Actinomycinsynthetasen zur Verfügung stand, stellte sich die Gewinnung aktiver rekombinanter Peptidsynthetasen durch die Expression der erzeugten rekombinanten NRPS-Gene dennoch in einigen Fällen als weiterhin schwierig heraus. Die beobachteten Plasmidinstabilitäten können eventuell als Hinweis darauf gedeutet werden, dass die Expression der rekombinanten NRPS-Gene für die Transformantenstämmen einen deutlichen Selektionsnachteil gegenüber nichtexprimierenden Stämmen darstellt. Eventuell wäre für weitere Arbeiten an diesen oder ähnlichen rekombinanten NRPS-Genen die Expression unter Kontrolle eines induzierbaren Promotors ratsam. Allerdings ist, da in dem als instabil ΖU betrachtenden Konstrukt pJMLMyx-1 ein Genfragment aus Stigmatella aurantiaca enthalten ist, auch eine DNA-Inkompatibilität als Ursache für die angenommene Plasmid-Instabilität nicht auszuschließen.

6. Literatur

Admiraal, S.J., Walsh, C.T., and Khosla, C. (2001). The Loading Module of Rifamycin Synthetase Is an Adenylation-Thiolation Didomain with Substrate Tolerance for Substituted Benzoates. *Biochemistry* **40**, 6116-6123.

Aron, Z.D., Dorrestein, P.C., Blackhall, J.R., Kelleher, N.L., and Walsh, T.C. (2005). Characterization of a New Tailoring Domain in Polyketide Biosynthesis: The Amine Transferase Domain of MycA in the Mycosubtilin Gene Cluster. JACS 127, 14986-14987.

Austin, M.B., and Noel, J.P. (2003). The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases. Nat. Prod. Rep. 20(1), 79-110.

Belshaw, P.J., Walsh, C.T., and Stachelhaus, T. (1999). Aminoacyl-CoAs as Probes of Condensation Domain Selectivity in Nonribosomal Peptide Synthesis. *Science* 284, 486-489.

Bevitt, D.J., Cortés, J., Haydock, S.F., and Leadlay, P. (1992). 6-Deoxyerythronolide B synthase from Saccharopolyspora erythrea. Cloning of the structural gene, sequence analysis and infered domain structure of the multifunctional gene. *Eur. J. Biochem.* **204**, 39-49.

Bibb, M.J. (2005). Regulation of secondary metabolism in streptomyces. Curr. Op. Microbiol. 8, 208-215.

Billich, A., and Zocher, R. (1987). Enzymatic synthesis of cyclosporin A. J. Biol. Chem. 262, 17258-17259.

Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Ac. Res.* 7, 1513-1523.

Bisang, C., Long, P. F., Corte´s, J., Westcott, J., Crosby, J., Matharu, A. L., Cox, R. J., Simpson, T. J., Staunton, J., and Leadlay, P. F. (1999) A chain initiation factor common to both modular and aromatic polyketide synthases. *Nature* **401**, 502–505.

Bourn, W. and Babb, B. (1995). Computer assisted identification and classification of streptomycete promoters. Nucl. Ac. Res. 23, 3696-3703.

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

Bralley, P. and Jones, G.H. (2003) Overexpression of the polynucleotide phosphorylase gene (pnp) of Streptomyces antibioticus affects mRNA stability and poly(A) tail length but not ppGpp levels, *Microbiology*. **149**, 2173-2182.

Campelo, A.B. and Gil, J.A. (2002). The candicidin gene cluster from *Streptomyces griseus* IMRU 3570. *Microbiology* **148**, 51–59.

Cane, D.E. and Walsh, C.T. (1999). The parallel and convergent universes of polyketide syntheses and nonribosomal peptide synthetases. Chem Biol. 6, R319-R325.

Cane, D.E., Walsh, C.T. and Khosla, C. (1998). Harnessing the biosynthetic code: combinations, permutations, and mutations. *Science* 282, 63-68.

Cao, S., Yang, Y., Ngo, N.L. and Guo, Z. (2005). Macrolactonization catalyzed by the terminal thioesterase domain of the nonribosomal peptide synthetase responsible for lichenysin biosynthesis. *Bioorg Med Chem Lett.* **15** (10), 2595-2599.

Challis, G.L., Ravel, J., and Townsend, C.A. (2000) Predictive, structure-based model of amino acid recognition by nonribosomal peptide synthetase adenylation domains. *Chem Biol.* **7**(3), 211-24.

Chandran, S., Menzella, H.G., Carney, J.R., and Santi, D.V. (2006). Activating Hybrid Modular Interfaces in Synthetic Polyketide Synthases by Cassette Replacement of Ketosynthase Domains. *Chemistry & Biology* **13**, 469-474.

Chen, H., O'Connor, S., Cane, D.E., and Walsh, C.T. (2001). Epothilone biosynthesis: assembly of the methylthiazolylcarboxy starter unit of the EpoB subunit. *Chem Biol.* **9**, 899-912

Chen H., and Walsh, C.T. (2001). Coumarin formation in novobiocin biosynthesis: β-hydroxylation of the aminoacyl enzyme tyrosyl-S-NovH by a cytochrome P450 NovI. *Chem Biol.* **8**, 301-312.

Conti., E., Franks, N.P., and Brick, P. (1996). Crystal structure of firefly luciferase throws light on a superfamily of adenylate-forming enzymes. Structure 4, 287-289.

Conti., E., Stachelhaus, T., Marahiel, M.A. and Brick, P. (1997) Structural basis for the activation of phenylalanine in the nonribosomal biosynthesis of gramicidin S. EMBO J. 16, 4174-4183.

Correia, T., Grammel, N., Ortel, I., Keller, U., and Tudzynski, P. (2003) Molecular cloning and analysis of the ergopeptine assembly system in the ergot fungus Claviceps purpurea. Chem Biol. 10, 1281-92.

Cortes, J., Weismann, K.E.H., Roberts, G.A., Brown, M.J.B., Staunton, J., and Leadlay, P.F. (1995). Repositioning of a domain in a modular polyketide synthase to promote specific chain cleavage. *Science* **268**, 1487-1489.

Coque, J.J.R., De le Fuente, J.L., Liras, P., and Martin, J.F. (1996). Overexpression of the Nocardia lactamdurans α -aminoadipyl-cisteinyl-valine synthetase in Streptomyces lividans. Eur. J. Biochem. 242, 264-270.

de Ferra, F., Rodriguez, F., Tortora, O., Tosi, C., and Grandi, G. (1997). Engineering of Peptide Synthetases. J. Biol. Chem. 272 (40), 25304-25309.

Doekel, S., and Marahiel, M.A. (2000). Dipeptide formation on engineered hybrid peptide synthetases. *Chem. Biol.* **7**, 373-384.

Donadio, S., Staver, M.J., McAlpine, J.B., Swanson, S.J., and Katz, L. (1991). Modular organisation of genes required for complex polyketide biosynthesis. *Science* 252, 675-679.

Du, L., Chen, M., Sánchez, C. and Shen, B. (2000). An oxidation domain in the BlmIII non-ribosomal peptide synthetase probably catalyzing thiazole formation in the biosynthesis of the anti-tumor drug bleomycin in Streptomyces verticillus ATCC15003. FEMS Micobiol. Letters **189**, 171-175.

Du, L., Sánchez, C., Chen, M., Edwards, D.J. and Shen, B. (2000). The biosynthetic gene cluster for the antitumor drug bleomycin from Streptomyces verticillus ATCC15003 supporting functional interactions between nonribosomal peptide synthetases and a polyketide synthase. Chem Biol. 7, 623-642.

Egan, S., Wiener, P., Kallifidans, D., and Wellington, E.M. (1998). Transfer of streptomycin biosynthesis gene clusters within streptomycetes isolated from soil. Appl. Environ. Microbiol. 64, 5061-5063.

Ehmann, D.E., Trauger, J.W., Stachelhaus, T. and Walsh, C.T. (2000). Aminoacyl-SNACs as small-molecule substrates for the condensation domains of nonribosomal peptide synthetases. *Chem Biol.* **7**, 765-772.

Eppelmann, K., Stachelhaus, T. and Marahiel, M.A. (2002). Exploitation of the Selectivity-Conferring Code of Nonribosomal Peptide Synthetases for the Rational Design of Novel Peptide Antibiotics. *Biochemistry*, **41**, 9718-9726.

Finking, R. and Marahiel, M.A. (2004). Biosynthesis of Nonribosomal Peptides. Annu. Rev. Micobiol., 58, 453-488.

Gallo, M., and Katz, E. (1971). Regulation of Secondary Metabolite Biosynthesis: Catabolite Repression of Phenoxazinone Synthase and Actinomycin Formation by Glucose. J. Bact. 109, 659-667.

Gokhale R.S., Tsuji, S.Y., Cane, D.E, and Khosla, C. (1999), Dissecting and exploiting intermodular communication in polyketide synthases. Science 284, 482-485

Ginolhac, A., Jarrin, C., Gillet, B., Robe, P., Pujic, C., Tuphile, K., Bertrand, H., Vogel, T.M., Perriere, G., Simonet, P. and Nalin, R. (2004). Phylogenetic Analysis of Polyketide Synthase I Domains from Soil Metagenomic Libraries Allows Selection of Promising Clones. *Applied and Envirtomental Microbiology*, **70**, 5522-5527

Glinski, M., Urbanke, C., Hornbogen, T., and Zocher, R. (2002). Enniatin synthetase is a monomer with extended structure: evidence for an intramolecular reaction mechanism. Arch Microbiol., **178**, 267-273

Hahn, M. and Stachelhaus, T. (2004). Selective interaction between nonribosomal peptide synthetases is facilitated by short communication-mediating domains. *PNAS*, **101**, 15585-15590

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

Handelsman, J., Rondon, M.R., Brady, S.F., Clardy, J. and Goodman, R.M. (1998). Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chem Biol.*, 5, R245-249

Henkin, T.M., Grundy, F.J., Nicholson, W.L., and Chmabliss, G.H. (1991). Catabolite repression of α -amylase gene expression in Bacillus subtilis involves a trans-acting gene product homologous to the Escherichia coli lacl and galR repressors. Mol. Microbiol., **5**, 575-584.

Ishizuka, H., Horinouchi, S., Kieser, H.M., Hopwood, D.A., and Beppu, T. (1992). A Putative Two-Component Regulatory System Involved in Secondary Metabolism in Streptomyces spp., J. Bact, 174, 7585-7594

Jones, G.H. and Hopwod, D.A. (1984). Molecular cloning and expression of the phenoxazinone synthase gene from Streptomyces antibioticus. J. Biol. Chem. 259, 14151-14157

Jones, G.H. (2000). Actinomycin Production Persists in a Strain of Streptomyces antibioticus Lacking Phenoxazinone Synthase. Antimicrobial Agents and Chemotherapy **44**(5), 1322-1327

Jones, G.H., Paget, M.S.B., Chamberlin, L., and Buttner, M.J. (1997). Sigma-E is required for the production of the antibiotic actinomycin in Streptomyces antibioticus. Mol. Microbiol., 23, 169-178

Joshi, A.K., Wiłkowski, A., Berman, H.A., Zhang, L., and Smith, S. (2005). Effect of Modification of the Length and Flexibility of the Acyl Carrier Protein-Thioesterase Interdomain Linker on Functionality of the Animal Fatty Acid Synthase. *Biochemistry* **44**, 4100-4107

Katz, L. and Donadio, S. (1993). Polyketide Synthesis: Prospects for Hybrid Antibiotics. Ann. Rev. Microbiol., 47, 875-912

Katz, E., Thompson, C.J., and Hopwood, D.A. (1983). Cloning and Expression of the tyrosinase gene from Streptomyces antibioticus in Streptomyces lividans. J. Gen. Microbiol. 129, 2703-2714

Keating, A., Ehmann, D., Kohli, R.M., Marshall, C.G., Trauger, J.W., and Walsh, C.T. (2001). Chain Termination Steps in Nonribosomal Peptide Synthetase Assembly Lines: Directed Acyl-S-Enzyme Breakdown in Antibiotic and Siderophore Biosynthesis. *Chembiochem.* **2**, 99-107

Keller, U., Kleinkauf, H. and Zocher, R. (1984). 4-metyh-3-hydroxyanthranilic acid activating enzyme from actinomycinproducing *Streptomyces chrysomallus*. *Biochemistry* 23, 1479-1484

Keller, U. and Schauwecker, F. (2001). Nonribosomal Biosynthesis of Microbial Chromopeptides. Progress in Nucleic Acid Resarch 70, 233-289

Keller, U. and Schlumbohm, W. (1991). Purification and Charaterization of Actinomycin Synthetase I, a 4-Methyl-3-hydroxyanthranilic Acid-AMP Ligase from *Streptomyces chrysomallus*. J. Biol. Chem. **267**(17), 11745-11752

Keller U., Krengel U., and Haese A. (1985) Genetic analysis in Streptomyces chrysomallus. J Gen Microbiol., 131(5), 1181-91.

Kieser, T., Bibb, M.J., Buttner, M.J., Chater, K.F., and Hopwood, D.A. (2000). Practical Streptomyces Genetics, The John Innes Foundation, Norwich

Kim, J.E., Guverner, Z.T., Cho, J.Y., Chung, K., and Chambliss, G.H. (1995). Specificity of DNA Binding Activity of the Bacillus subtilis Catabolite Control Protein CcpA. J. Bact. 177, 5129-5134

Kleinkauf H., and von Döhren H. (1996) A nonribosomal system of peptide biosynthesis. Eur J Biochem. 236(2), 335-51.

Konig A, Schwecke T, Molnar I, Bohm GA, Lowden PA, Staunton J, and Leadlay PF. (1997). The pipecolate-incorporating enzyme for the biosynthesis of the immunosuppressant rapamycin--nucleotide sequence analysis, disruption and heterologous expression of rapP from *Streptomyces hygroscopicus*. *Eur J Biochem.* **247**(2), 526-34.

Konz, D., and Marahiel, M.A. (1999). How do peptide synthetases generate structural deversity? Chem. Biol. 6, R39-R48

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227, 680-685.

Lai, J.R., Fischbach, M.A., Liu, D.R., and Walsh, C.T. (2006). A protein interaction surface in nonribosomal peptide synthesis mapped by combinatorial mutagenisis and selection. *PNAS* **103**(14), 5314-5319

Linne, U., and Marahiel, M.A. (2000). Control of directionality in nonribosomal peptide synthesis: role of the condensation domain in preventing misinitiation and timing of epimerization. *Biochemistry*. **39**(34), 10439-10447.

Linne U., Doekel S., and Marahiel M.A. (2001) Portability of epimerization domain and role of peptidyl carrier protein on epimerization activity in nonribosomal peptide synthetases. *Biochemistry*. **40**(51), 15824-15834.

Lipman, F., Gevers, W., Kleinkauf, H., and Roskoski, R., Jr. (1971). Polypeptide synthesis on protein templates: the enzymatic synthesis of gramicidin S and tyrocidine. Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. 35, 1-34

Luo, L., Kohli, R.M., Onishi, M., Linne, U., Marahiel, M.A., and Walsh, C.T. (2002). Timing of Epimerization and Condensation Reactions in Nonribosomal Peptide Assembly Lines: Kinetic Analysis of Phenylalanine Activating Elongation Modules of Tyrocidine Synthetase B. *Biochemistry* **41**, 9184-9196

Nicholas, K.B. and Nicholas, H.B. (1997). GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. (Distributed by the author)

Marahiel, M.A., Stachelhaus, T., and Mootz, H.D. (1997). Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis. Chem. Rev. 97, 2651-2673.

McDaniel, R., Ebert-Khosla, S., Hopwood, D.A. and Khosla, C. (1995). Rational design of aromatic polyketide natural products by recombinant assembly of enzymatic subunits. Nature 375, 549-554

McDaniel, R., Thamchaipenet, A., Gustafsson, C., Fu, H., Betlach, M., Betlach, M., and Ashley, G. (1999). Multiple genetic modifications of the erythromycin polyetide synthase to produce a libary of novel "unnatural" natural products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**(5), 1846-1851.

McDaniel, R., Welch, M., and Hutchinson, C.R. (2005). Genetic Approaches to Polyketide Antibiotics. 1. Chem. Rev. 105(2), 543-558

Mootz, H.D. and Marahiel, M.A. (1997). The Tyrocidine Biosynthesis Operon of Bacillus brevis: Complete Nucleotide Sequence and Biochemical Charaterization of Functional Internal Adenylation Domains. J. Bacteriol. 179(21), 6843-6850

Mootz H.D., Schwarzer D., and Marahiel M.A. (2000). Construction of hybrid peptide synthetases by module and domain fusions. Proc Natl Acad Sci U S A. 97(11), 5848-5853

Nakano, M.M., Marahiel, M.A., and Zuber, P. (1988). Identification of a genetic locus required for biosynthesis of the lipopeptide antibiotic surfactin in Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 170, 5662-5668

Nguyen, J. (1999) The regulatory protein Reg1 of Streptomyces lividans binds the promoter region of several genes repressed by glucose. FEMS Microbiol. Letters 175, 51-58

Nguyen, J., Francou, F., Virolle, M.J. and Guerineau, M. (1997) Amylase and Chitinase Genes in Streptomyces lividans Are Regulated by reg1, a Pleiotropic Regulatory Gene. J. Bact. 179 (20), 6383-6390

Olynyk, M., Brown, M.J.B., Cortes, J., Staunton, J., and Leadlay, P.F. (1996). A hybrid modular polyketide sythase obtained by domain swapping. *Chem. Biol.* **3**, 833-839

Pfennig, F. (1998). Klonierung, Expression und Charakterisierung von Actinomycin-Biosynthesegenen aus Steptomyces. Dissertation an der Technischen Universität Berlin.

Pfennig, F., Schauwecker, F., and Keller, U. (1999). Moleculare Characterization of the Genes of Actinomycin Synthetase I and of a 4-Methyl-3-hydroxyanthranilic Acid Carrier Protein Involved in the Assembly of the Acylpeptide Chain of Actinomycin in Streptomyces. Journal of Biological Chemistry **274**(18), 12508-12516

Piper, R., Luo, G., Cane, D.E. and Khosla C. (1995). Cell-free synthesis of polyketides by recombinant erythromycin polyketide synthases. *Nature* 378, 263-266

Pojer F., Li S.M., and Heide L. (2002). Molecular cloning and sequence analysis of the clorobiocin biosynthetic gene cluster: new insights into the biosynthesis of aminocoumarin antibiotics. *Microbiology* **148**, 3901-3911

Romero, N.M., Parro, V., Malpartida, F., and Mellado, R. (1992). Heterologous activation of the actinorhodin biosynthetic pathway in *Streptomyces lividans*. Nuc. Ac. Res. 20, 2767-2772

Schauwecker F., Pfennig F., Grammel N., and Keller U. (2000). Construction and *in vitro* analysis of a new bi-modular polypeptide synthetase for synthesis of N-methylated acyl peptides. *Chem Biol.* **7**(4), 287-297.

Schauwecker, F., Pfennig, F. and Keller, U. (2001). Anaylses of the actinomycin biosynthesis gene cluster from Streptomyces chrysomallus. Posterpräsentation der Actinodrug GmbH.

Schauwecker, F., Pfennig, F., Schröder, W. and Keller, U. (1998). Molecular cloning of the actinomycin synthetases gene cluster from *Streptomyces chrysomallus* and heterologous functional expression of the actinomycin synthetases II gene. J. Bacteriol. **180**, 2468-2474

Schlumbohm, W., Stein, T., Ullrich, C., Vater, J., Krause, M., Marahiel, M.A., Kruft, V., and 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**(34), 23135-23141.

Schneider, A., Stachelhaus, T., Marahiel, M.A. (1998). Targeted alteration of the substrate specificity of peptide synthetases by rational module swapping. *Mol Gen Genet*. **257**(3):308-318.

Schwarzer, D., Mootz, H.D., Marahiel, M.A. (2001). Exploring the impact of different thioesterase domains for the design of hybrid peptide synthetases. *Chem Biol.* **132**, 1-14

Schwarzer, D., Mootz, H.D., Linne, U. and Marahiel. M.A. (2002). Regeneration of misprimed nonribosomal peptide synthetases by type II thioesterases. *PNAS* 99, 14083-14088

Schwecke, T., Aparicio, J.F., Molnar, I., Konig, A., Khaw, L.E., Haydock, S.F., Oliynyk, M., Caffrey, P., Cortes, J., and Lester, J.B. (1995) The biosynthetic gene cluster for the polyketide immunosuppressant rapamycin. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 7839–7843

Shaw-Reid, C.A., Kelleher, N.L., Losey, H.C., Gehring, A.M., Berg, C. and 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

Silakowski, B., Schairer, H.U., Ehret, H., Kunze, B., Weinig, S., Nordsiek, G., Brandt, P., Blöcker, H., Höfle, G., Beyer, S., and Müller, R. (1999). New Lessons for Combinatorial Biosynthesis from Myxobacteria. J. Biol. Chem. **274** (52), 37391-37399

Stachelhaus, T., Schneider, A., and Marahiel, M.A. (1995) Rational Design of Peptide Antibiotics by Targeted Replacement of Bacterial and Fungal Domains. Science, 269, 69-72

Stachelhaus, T., Mootz, H.D. and Marahiel, M.A. (1999). The specifity-confering code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases. *Chem Biol.* **6**, 493-505

Sambrock, J., Fritsch, E.F., and Manniatis, T. (1989). Molekular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Staunton, J. (1998). Combinatorial biosynthesis of erythromycin and complex polyketides. *Current* Opinion in Chemical Biology 2, 339-345

Staunton, J. and Weissman, K.J. (2001). Polyketide biosynthesis: a millenium review. Nat. Prod. Rep. 18(4), 380-416

Stein, T., Vater, J., Kruft, V., Otto, A., and Wittmann-Liebold, B. (1996). The multiple carrier model of nonribosomal peptide biosynthesis at modular multienzymatic templates. J. Biol. Chem. 271, 15428–35

Stein, T., Vater, J., Kruft, V., Wittmann-Liebold, B., Franke, P., Panico, M., Mc Dowell, R., and Morris, H.R. (1994) Detection of 4'-phosphopantetheine at the thioester binding site for L-valine of gramicidinS synthetase 2. *FEBS Lett.* 1994 **340**, 39-44.

Stindl, A. (1993). Untersuchungen zur Struktur und Funktion der Actinomycin Synthetasen. Dissertation an der Technischen Universität Berlin.

Stindl, A., and Keller, U. (1993) The initiation of peptide formation in the biosynthesis of actinomycin. J. *Biol. Chem.* **268**(14), 10612-10620

Stindl, **A.**, **and Keller**, **U.** (1994) Epimerization of the D-valine portion in the biosynthesis of actinomycin D. *Biochemistry* **33**(31), 9358-9364.

Strohl, W.R. (1992). Compilation and analysis of DNA sequences assiociated with apparent streptomycete promoters. *Nucl. Ac. Res.* 20, 961-974

Tang, L., Shah, S., Chung, L., Carney, J., Katz, L., Khosla, C. and Julien, B. (2001). Cloning and Heterologous Expression of the Epothilone Gene Cluster. Science 287, 640-642

Thomson, J.D., Gibson, T.J., Plewinak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D.G. (1997). The ClustalX windows interface: flexible stratagies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nuc. Acid. Res.* **24**, 4876-4882

Tillett, D., Dittmann, E., Erhard, M., von Döhren, H., Börner, T., and Neilan, B.A. (2000). Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide-polyketide synthetase system. *Chem Biol.* **7**, 753-764

Trauger, J.W., Kohli, R.M., Mootz, H.D., Marahiel, M.A. and Walsh, C.T. (2000). Peptide cyclization catalysed by the thioesterase domain of tyrocidine synthetase. *Nature* **407**, 215-218

Treusch, H. and Schleper, C. (2005). Environmental Genomics: A Novel Tool or Study of Uncultivated Miroorganisms. In: Handbook of Genome Research (Edit. Sensen, C.W.), Wiley-VCH, Weinheim, 2005

Tsai S-C., , Miercke, L.J., Krucinski, J., , Gokhale, R., Chen, J., Foster, P.G., Cane, D.E., Khosla, C., and Stroud, R.M. (2001). Crystal structure of the macrocycle-forming thioesterase domain of the erythromycin polyketide synthase: Versatility from a unique substrate channel. *PNAS* **98**, 14808–14813

Tsuji, S.Y., Cane, D.E., and Khosla, C. (2001) Selective Protein-Protein Interactions Direct Channeling of Intermediates between Polyketide Synthase Modules. *Biochemistry* **40**(8), 2326-2331

Walsh, C. (2000). Molecular mechanics that confer antibacterial drug resistance. Nature 406, 775-781

Weickert, M.J., and Chambliss, G.H. (1990). Site-directed mutagenesis of a catabolite repressor operator sequence in Bacillus subtilis. Proc. Natl. Acad. Sci. 87, 6238-6242

Weisman, K.J., Hong, H., Popovic, B., and Meersman, F. (2006). Evidence for a protein-protein interaction motif on an acyl carrier protein domain from a modular polyketide synthase. *Chem Biol.* **13**, 625-636

Williams, W.K., and Katz, E. (1976). Development of a Cemically Defined Medium for the Synthesis of Actinomycin D by Streptomyces parvulus. Antim. Agents and Chemotherapy 11, 281-290

Wilkins, M.R., Gasteiger, E., Bairoch, A., Sanchez, J.C., Williams, K.L., Appel, R.D., and Hochstrasser, D.F. (1999). Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. *Methods Mol Biol.* **112**, 531-552

von Döhren, H., Keller U., Vater, J., and Zocher, R. (1997). Multifunctional Peptide Synthetases. Chem. Rev. 97, 2675-2705

von Döhren, H., Dieckmann, R., and Pavela-Vrancic, M. (1999). The nonribisomal code. Chem Biol. 6, R273-279

Yakimov M.M., Giuliano L., Timmis K.N., Golyshin P.N. (2000) Recombinant acylheptapeptide lichenysin: high level of production by Bacillus subtilis cells. J Mol Microbiol Biotechnol. 2(2), 217-24.

Yanisch-Perron, C. Vieira, J. and Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: Nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. Gene 33, 103-119

Zhang Y.M., Rao M.S., Heath R.J., Price A.C., Olson A.J., Rock C.O., and White S.W. (2000) Identification and analysis of the acyl carrier protein (ACP) docking site on beta-ketoacyl-ACP synthase III. J Biol Chem. 276(11), 8231-8238.

Zocher, R., Keller, U., and Kleinkauf, H. (1982). Enniatin synthetase, a novel type of multi-functional enzyme catalysing depsipeptide synthesis in Fusarium oxysporum. Biochemistry, 21, 43-48.

Zocher, R. and Keller, U. (1997). Thiol Template Peptide Sythesis Systems in Bacteria and Fungi. Adv. microb. phys. 38, 85-131.

Danksagung

Mein Dank gilt allen, die mich im Laufe meiner Promotion unterstützt und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Insbesondere möchte ich mich bei Herrn Dr. U. Keller und Dr. J. Vater für die hervorragende Betreuung bedanken.

Herrn Prof. Dr. R. Süssmuth danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Herrn Dr. F. Schauwecker danke ich für die Einführung auf dem Arbeitsgebiet der rekombinanten Peptidsynthetasen und für andauernde Unterstützung.

Herrn Dr. F. Pfennig danke ich für Beratung und für die Klonierungen an den Fusionskonstrukten des Initiationsmodules.

Herrn Ingo Ortel danke ich für die im Rahmen seiner Diplomarbeit durchgeführten Untersuchungen an den acm-Promotoren. Natascha Lewe, Susanne Diel und Dr. Gernot Schmoock danke ich für gute Zusammenarbeit, Hilfsbereitschaft und ein angenehmes Klima in der Arbeitsgruppe.

Herrn Dr. Zocher und allen Mitgliedern seines Arbeitskreises danke ich für vielfältige Unterstützung.