

2 Grundlagen und Theorie

2.1 Modulare Organisation der nichtribosomalen Peptidsynthetasen

Antibiotika zeichnen sich durch eine Vielzahl chemischer Strukturen aus, zu denen Aminoglycoside (Streptomycin, Kanamycin), Anthracycline (Nogalamycin), makrocyclische Lactone (Erythromycin), Chinone (Tetracyclin), und Chinoline (Ciprofloxacin) genauso gehören wie Peptidantibiotika. Deren Strukturen wiederum sind ebenso mannigfaltig und umfassen lineare (Bialaphos), cyclische (Cyclosporin, Gramicidin S, Tyrocidin A), verzweigt cyclische (Bacitracin), Glyco- (Vancomycin, Bleomycin), Lipo- (Surfactin, Fengycin, Lichenysin, Mycosubtilin) und Depsipeptide (Enniatin, Pristinamycin I, Syringomycin) sowie Peptidolactone (Actinomycin) und β -Lactame (ACV-Tripeptid/Precursor von Penicillin und Cephalosporin). In Abbildung 2.1 sind fünf der bekanntesten Peptidantibiotika dargestellt.

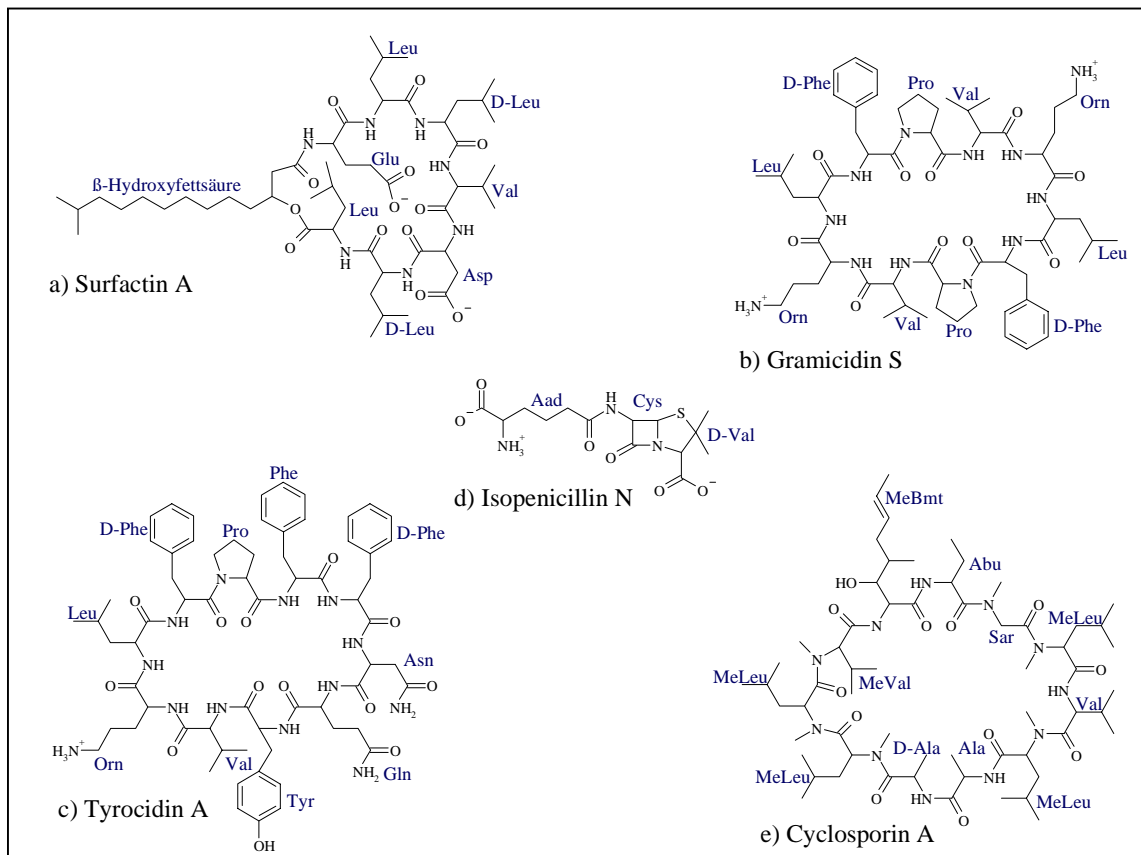


Abb. 2.1: Chemische Strukturen ausgewählter bakterieller (a-c) und fungaler (d, e) Peptidantibiotika zu den in Abbildung 2.2a-e dargestellten NRPS. Orn: Ornithin; Aad: δ -L- α -Aminoadipinsäure; Bmt: (4R)-4-[(E)-2-butenyl]-4-methyl-L-threonin; Abu: L- α -Aminobuttersäure; Sar: Sarcosin; Me*: N-methylierte Aminosäure

Entsprechend ihres Syntheseweges wird zwischen der ribosomalen und nichtribosomalen Peptidsynthese unterschieden. Nur wenige Peptidantibiotika (z.B. Nisin und Subtilin) werden über den ribosomalen Proteinsyntheseweg gebildet, bei der die Basensequenz der DNA unter

Mitwirkung von Ribosomen, mRNA, tRNA, Aminoacyl-tRNA-Synthetasen und zahlreichen Proteinfaktoren in die Aminosäuresequenz des fertigen Proteins translatiert wird. Dagegen wird die Mehrzahl der Peptidantibiotika nichtribosomal an riesigen Multienzymkomplexen synthetisiert, den sogenannten Nichtribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS). Im Gegensatz zur DNA-abhängigen ribosomalen Proteinbiosynthese dienen bei der nichtribosomalen Peptidsynthese multifunktionelle Enzyme als spezifische Proteinmatrizen, die sowohl die Aminosäuresequenz als auch die Modifizierung des fertigen Peptids festlegen. In bis zu 40 Einzelstufen werden kurzkettige Peptide gebildet, deren beachtliche Vielfalt auf dem Einbau von z.T. recht ungewöhnlichen Einzelbausteinen beruht. Dazu gehören neben den 20 proteinogenen Aminosäuren mehr als 300 Verbindungen wie Hydroxysäuren, D- und β -Aminosäuren sowie N-methylierte Aminosäuren (Marahiel et al., 1997b; von Döhren et al., 1999; Konz and Marahiel, 1999a; Mootz and Marahiel, 1999). In einigen Fällen wird das entstandene Peptid erst durch zusätzliche Enzyme in seine biologisch aktive Form umgewandelt, beispielsweise durch Acylierungen (z.B. Acyltransferase bei Surfactin; Menkhaus et al., 1993), Glycosilierungen (z.B. Glycosyltransferase bei Vancomycin; Cane et al., 1998) oder Heterocyclisierungen (z.B. β -Lactam-Ringbildung durch Isopenicillin-N-Synthase bei β -Lactam-Antibiotika; Marahiel et al., 1997b; Mootz and Marahiel, 1999). Während durch das ribosomale System Proteine mit Kettenlängen von 10.000 und mehr Aminosäuren geknüpft werden können, begrenzt sich die Länge nichtribosomal synthetisierter Peptide auf durchschnittlich 2 bis 15 Aminosäurereste. Das längste derzeit bekannte Produkt Polytheonamid besteht aus 48 Aminosäuren (Kleinkauf and von Döhren, 1996; Mootz and Marahiel, 1999).

Obwohl bereits 1954 von Lipmann postuliert (Lipmann, 1954), wurde die erste Polyenzym-Matrize erst 1971 entdeckt (Kleinkauf et al., 1992). Inzwischen wurden zahlreiche Gene und Genfragmente bakteriellen und fungalen Ursprungs identifiziert, kloniert und sequenziert, die die Entschlüsselung eines einheitlichen Organisationsprinzips der NRPS ermöglichen, wie z.B. der Surfactin-Synthetase (Abb. 2.2a; Cosmina et al., 1993; Fuma et al., 1993), der Gramicidin S-Synthetase (Abb. 2.2b; Hori et al., 1989; Krätzschar et al., 1989; Turgay et al., 1992), der Tyrocidin A-Synthetase (Abb. 2.2c; Weckermann et al., 1988; Mootz and Marahiel, 1997b), der ACV-Synthetase (Abb. 2.2d; MacCabe et al., 1991), der Cyclosporin-Synthetase (Abb. 2.2e; Weber, G. et al., 1994), der Enniatin-Synthetase (Haese et al., 1993), der Fengycin-Synthetase (Tosato et al., 1997), der Bacitracin-Synthetase (Konz et al., 1997) und der Lichenysin-Synthetase (Konz et al., 1999b). Demnach sind NRPS aus separaten Modulen zusammengesetzt, die als semiautonome Enzyme die Erkennung, Aktivierung und Thiolierung sowie gegebenenfalls die Modifizierung (z.B. Epimerisierung oder N-Methylierung) der jeweiligen Peptidaminosäure katalysieren. Dabei wird die Aminosäuresequenz und die Länge des fertigen Peptidprodukts durch die Anzahl und Reihenfolge der Module innerhalb der NRPS festgelegt (Colinearitäts-Regel; Stein et al.,

1996; Marahiel et al., 1997b). Jedoch wurde bei Strukturvergleichen beobachtet, daß sich prokaryotische und eukaryotische NRPS in ihrer Organisationsform unterscheiden (Abb. 2.2).

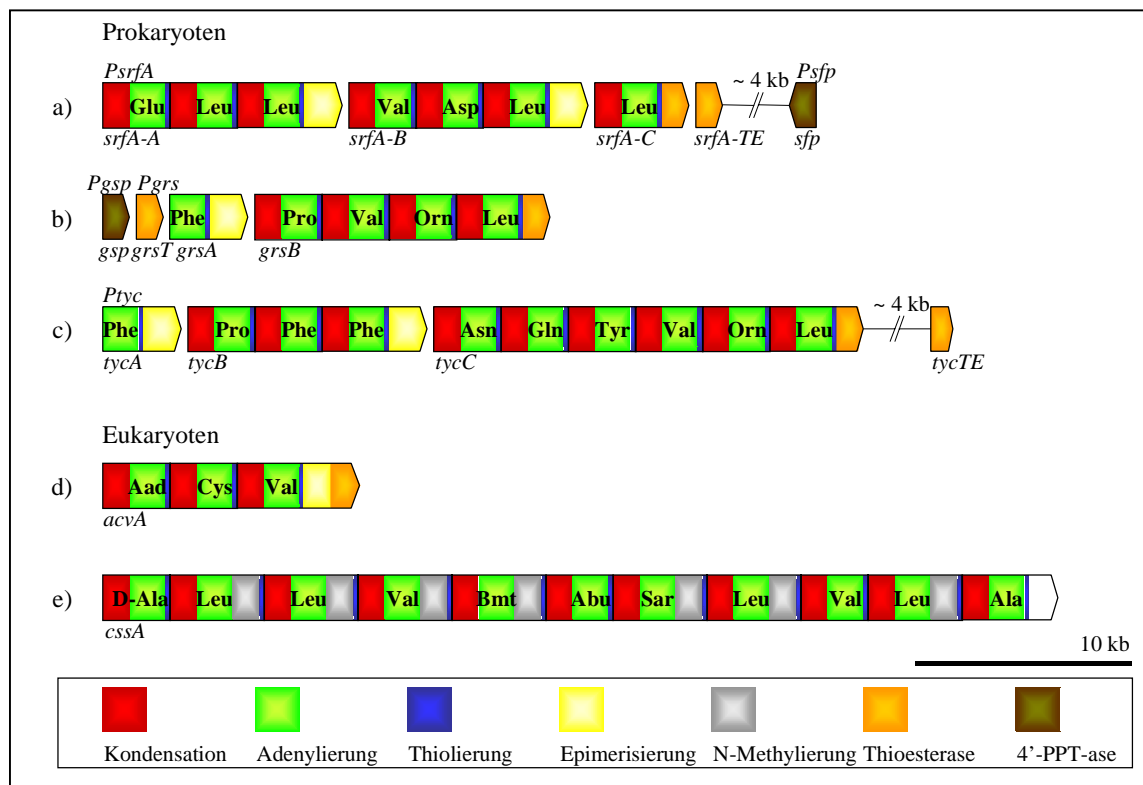


Abb. 2.2: Modulare Organisation prokaryotischer (a) Surfactin: *srfA*; b) Gramicidin S: *grs*; c) Tyrocidin A: *tyc*) und eukaryotischer Peptidsynthetasen (d) ACV/Penicillin-Precursor: *acvA*; e) Cyclosporin A: *cssA*). Die Module aller NRPS selbst sind in verschiedene funktionelle Domänen untergliedert, die jeweils eine spezifische Reaktion katalysieren. Die Farbcodierung dieser Domänen ist angegeben, die Module sind eingerahmt. Orn: Ornithin; Aad: δ -L- α -Aminoadipinsäure; Bmt: (4R)-4-[(E)-2-butenyl]-4-methyl-L-threonin; Abu: L- α -Aminobuttersäure; Sar: Sarcosin

So zeigen prokaryotische Proteintemplates eine charakteristische Operonstruktur, die zwischen einem und acht Module in Multienzymkomplexen vereint (Abb. 2.2a-c; von Döhren et al., 1997; Marahiel et al., 1997b). Dabei entspricht die Menge der aktivierten und teilweise modifizierten Aminosäuren genau der Anzahl der integrierten Module. Beispielsweise aktivieren die monomodularen Peptidsynthetasen GrsA und TycA der Gramicidin S- bzw. der Tyrocidin A-Synthetase jeweils ausschließlich die Aminosäure L-Phenylalanin (Phe), die umgehend zu D-Phe epimerisiert wird. Entsprechend aktivieren die tetra- (GrsB) sowie tri- (TycB) und hexamodularen (TycC) Peptidsynthetasen vier, drei und sechs Aminosäuren (Abb. 2.2a-c). Im Gegensatz zu den bakteriellen Operons liegen in fungalen Systemen alle Module auf einer einzigen Peptidkette. Typische Vertreter dieser Klasse sind die trimodulare ACV- und die 11-modulare Cyclosporin A-Synthetase, die für die Synthese des Tripeptids δ -(L- α -Aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valin (Penicillin-Precursor) bzw. des Cycloundecapeptids Cyclosporin A zuständig sind und durch die Gene *acvA* und *cssA* kodiert werden (Abb. 2.2d und e; Marahiel, 1997a). Besonders beeindruckend ist die Größe des *cssA*-Gens,

welches mit 45,8 kb das größte bisher bekannte Gen ist und für ein Polypeptid von 1,6 MDa kodiert (Weber, G. et al., 1994; von Döhren et al., 1997).

2.2 Der Multienzym Thiotemplate Mechanismus

Trotz ihrer strukturellen Vielfalt wird die Mehrzahl dieser biologisch aktiven Peptide nach einem einheitlichen Mechanismus synthetisiert, dem Multienzym Thiotemplate Mechanismus (Marahiel et al., 1997b). Die Bezeichnung leitet sich einerseits von den multifunktionellen Enzymkomplexen ab, an denen die Peptidsynthese stattfindet, andererseits beruht sie auf der Entdeckung der Thioester, die den Transport der wachsenden Peptidkette übernehmen. Dem Modell zufolge verläuft die Aktivierung der Aminosäuren in zwei Stufen. Im ersten Schritt erfolgt die Aktivierung einer Aminosäure als enzymgebundenes Aminoacyladenylat unter Spaltung von ATP (Adenylierung), welches sofort im zweiten Schritt kovalent als Thioester an die Cysteamingruppe des enzymgebundenen 4'-Phosphopantethein-Cofaktors (4'-PP) gebunden wird (Aminoacylierung; Konz and Marahiel, 1999a). Ursprünglich wurde vermutet, daß in Analogie zur Fettsäuresynthese ein zentraler Carrier mit dem Cofaktor 4'-PP verknüpft ist (Lipmann et al., 1971). Diese Hypothese wurde jedoch durch die molekulargenetischen Untersuchungen der ersten Peptidsynthetase-Gene revidiert (Schlumbohm et al., 1991; Turgay et al., 1992) und durch ein Multiples Carrier Modell ersetzt, bei dem jedes NRPS-Modul eine eigene 4'-PP-Bindungsstelle enthält (Stein et al., 1996). Die 4'-PP-Cofaktoren dienen dabei als „schwingende Arme“, welche die wachsende Peptidkette an die Reaktionszentren der darauffolgenden Module übertragen (Mootz and Marahiel, 1997a; Weber, T. et al., 2000). Dort erfolgt durch eine Reihe gerichteter Transpeptidierungsreaktionen der schrittweise Einbau der aktivierten Aminosäuren in die Peptidkette. Während dieser Peptidelongation bleiben alle Zwischenprodukte kovalent an den Enzymkomplex gebunden. Erst wenn die Peptidkette fertiggestellt ist, wird sie durch eine Thioesterase- oder Cyclisierungsreaktion freigesetzt (Marahiel et al., 1997b; Leenders et al., 1998).

2.3 Die funktionellen Domänen der nichtribosomalen Peptidsynthetasen

Wie durch vergleichende Analyse der Primärstruktur verschiedener Peptidsynthetasen gezeigt werden konnte, können NRPS weiter in verschiedene funktionelle Domänen untergliedert werden (Abb. 2.3; Konz and Marahiel, 1999a), die jeweils spezifische Aufgaben übernehmen und durch flexible Regionen, sogenannte Linker, miteinander verbunden sind (Dieckmann et al., 1999; Mootz et al., 2000). Prinzipiell werden für die Produktbildung drei Domänen benötigt: die Adenylat-, die Thiolations- und die Kondensations-Domäne. Zusammen bilden diese drei Domänen ein Minimal-Elongationsmodul (Abb. 2.3; Linne and Marahiel, 2000). Zusätzlich können in die NRPS-Module Modifizierungsfunktionen integriert sein, wie z.B.

Epimerisierungs- und N-Methylierungs-Domänen (Abb. 2.3). Endständige Module innerhalb einer solchen Proteinmatrize besitzen darüber hinaus eine Thioesterase-Domäne (Abb. 2.3), die aufgrund ihrer Lokalisierung am C-Terminus vermutlich für die Freisetzung des fertigen Peptids verantwortlich ist (Marahiel, 1997a). Die Domänen können leicht anhand hochkonservierter Sequenzmotive identifiziert werden, welche jeder Domäne einen charakteristischen Fingerprint verleihen (Abb. 2.3 und Tab. 2.1; Konz and Marahiel, 1999a).

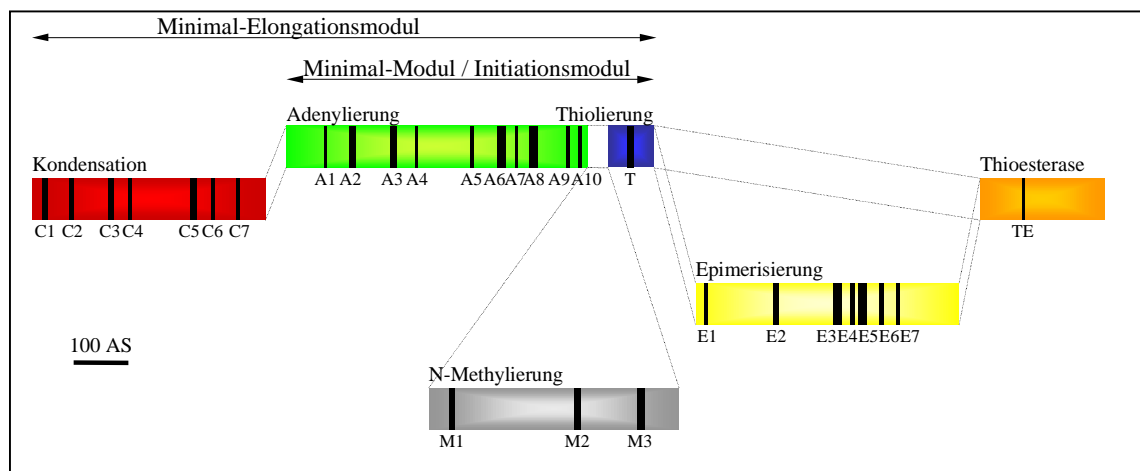


Abb. 2.3: Organisation ausgewählter an der nichtribosomalen Peptidsynthese beteiligten katalytischen Domänen mit ihren hochkonservierten Sequenzmotiven (nach Konz and Marahiel, 1999a). Die Adenylat-Domäne (grün) als das Herzstück aller NRPS, zählt zur Familie der adenylatbildenden Enzyme, zu denen auch die Acyl-CoA-Synthetasen und die Glühwürmchen-Luciferase gehören. Durch C-terminale Verknüpfung mit einer Thiolations-Domäne (auch als PCP-Domäne bezeichnet; blau) erhält man ein Minimalmodul, das naturgemäß nur in Initiationsmodulen vorkommt. Alle übrigen Module enthalten N-terminal eine Kondensations-Domäne (rot). Die resultierenden Module bezeichnet man als Elongationsmodule. Sowohl Initiations- als auch Elongationsmodule können C-terminal durch eine Epimerisierungs-Domäne (gelb) erweitert werden, im Gegensatz dazu sind N-Methylierungs-Domänen (grau) zwischen der Adenylat- und der PCP-Domäne inseriert. Zahlreiche endständige Module innerhalb einer Peptidsynthetase tragen am C-Terminus eine integrierte Thioesterase-Domäne (orange), die höchstwahrscheinlich für die Freisetzung des fertigen Peptids verantwortlich ist. Die Sequenzen der hochkonservierten Motive sind in Tabelle 2.1 zusammengestellt. Während der gesamten Arbeit wurden die Farbkodierungen aller Module beibehalten.

2. 3. 1 Die Adenylat-Domänen

Kernstück aller Peptidsynthetase-Module ist die Adenylat-Domäne (A-Domäne; Abb. 2.3, grün) mit einer mittleren Kettenlänge von 550 Aminosäuren. Dabei existiert für jede Peptid-aminosäure eine spezifische A-Domäne, deren Anordnung die Primärstruktur des fertigen Peptids festlegt. Aufgrund ihrer Sequenzhomologien und des Reaktionstyps werden die A-Domänen der Familie der adenylatbildenden Enzyme zugeordnet, zu denen ebenfalls die Acyl-CoA-Synthetasen und die Glühwürmchen-Luciferase zählen. Während jedoch die letzteren als autonome Enzyme vorliegen, existieren die A-Domänen der NRPS ausschließlich als integrierte Bereiche von Multienzymkomplexen. Allerdings konnte durch heterologe Expression diverser A-Domänen demonstriert werden, daß diese als funktionell eigenständige Abschnitte agieren (Dieckmann et al., 1995; Stachelhaus and Marahiel, 1995b; Konz et al.,

1999b). Sie enthalten eine Reihe hochkonservierter Kernsequenzen (Abb. 2.3 und Tab. 2.1), die für die Erkennung und Bindung der Substrate verantwortlich sind. Dabei sind die hohen Sequenzhomologien zwischen den einzelnen A-Domänen ein deutliches Indiz dafür, daß die Mehrzahl der Motive als ATP-Bindungsstellen fungieren (Tab. 2.1; Gocht and Marahiel, 1994; Hamoen et al., 1994).

Tab. 2.1: Die hochkonservierten Kernsequenzen der NRPS und ihre mutmaßlichen Funktionen (Pfeifer et al., 1995; Stachelhaus and Marahiel, 1995a; Stachelhaus et al., 1996 und 1999; Marahiel et al., 1997b; Konz and Marahiel, 1999a)

Motiv	Konsensussequenz	Funktion	
A1	L(T/S)YxEL		
A2	LKAG(G/A)AYVPID		
A3	YTSGTTGxPKG	ATP-Bindung / Adenylierung	
A4	FDxS	Aminosäure-Bindung (α -NH ₃ ⁺)	
A5	NxYGPTE	Aminosäure-Bindung	
A6	GEL(C/Y)IGGxGLARGYL	ATP-Bindung	
A7	Y(K/R)TGD	ATPase-Motiv	Adenylat-Domäne
A8	QVK(V/I)RGYRIELGEIE	ATP-Bindung / Adenylierung	
A9	LPxYM(I/V)P		
A10	NGK(V/L)DR	Aminosäure-Bindung (COO ⁻)	
T	D(D/N)FFxLGGHS(L/I)	4'-Phosphopantethein-Bindung	Thiolations-/PCP-Domäne
C1	SxAQxR(L/M)(W/Y)xL		
C2	RHExLRTxF		
C3 (His)	HHIIxDGVS	Peptidbindung / Elongation	Kondensations-Domäne
C4	YxD(F/Y)AVW		
C5	(I/V)GxFVNT(Q/L)(C/A)xR		
C6	(H/N)QD(Y/V)PFE		
C7	RDxSRNPL		
E1	PIQxWF		
E2 (His)	HHIIxDGVS	Abstraktion und Readdition des C α -Protons	
E3	AYxTEINDILLTALG		
E4	EGHGRExII		Epimerisierungs-Domäne
E5	RTVGWFTSQYPVLD		
E6	PxxGxGYG		
E7	FNYLGQFD		
M1	VL(E/D)xGxGxG	S-Adenosylmethionin (SAM)-Bindung	
M2	NELxYRYxAV		N-Methylierungs-Domäne
M3	VExSxARQxGxLD		
TE	GxSxG	Thioesteraseaktivität	Thioesterase-Domäne

In Analogie zum ribosomalen Syntheseweg verläuft die Aktivierung der Substrataminosäuren über zwei Stufen. In der ersten Stufe werden die Aminosäuren durch die A-Domänen als Aminoacyladenylate unter ATP-Spaltung aktiviert (Abb. 2.4). Anschließend erfolgt unter Mitwirkung der Thiolations-Domänen deren kovalente Bindung als Aminoacylthioester (Abb. 2.6; Kapitel 2.3.2)

Vor einiger Zeit gelang es erstmals, die Kristallstrukturen von zwei Familienmitgliedern der adenylatbildenden Enzyme zu lösen, der Glühwürmchen-Luciferase aus *Photinus pyralis* (Conti et al., 1996) und der A-Domäne der Phenylalanin-aktivierenden Gramacidin S-Synthetase (PheA-Domäne) von *Bacillus brevis* (Conti et al., 1997). Obwohl die Sequenzhomologie beider Enzyme mit nur 16 % Identität deutlich geringer ist als die der übrigen

A-Domänen der NRPS untereinander (30-60 %), gleichen sich deren 3-D-Strukturen. Es ist daher anzunehmen, daß alle Peptidsynthetase-A-Domänen eine einheitliche Struktur besitzen (Conti et al., 1997; Konz and Marahiel, 1999a). Demnach teilen sich die A-Domänen in eine große N-terminale und eine kleine C-terminale Subdomäne, die durch eine kurze drehbare Region („Scharnierregion“) miteinander verknüpft sind. Die beobachtete Veränderung der Orientierung der Subdomänen zueinander um 94° verglichen mit der ligandenfreien Luciferase-Struktur läßt vermuten, daß zur Stabilisierung der Adenylatstruktur die Lücke zwischen beiden Domänen geschlossen wird (Dieckmann et al., 1999; von Döhren et al., 1999).

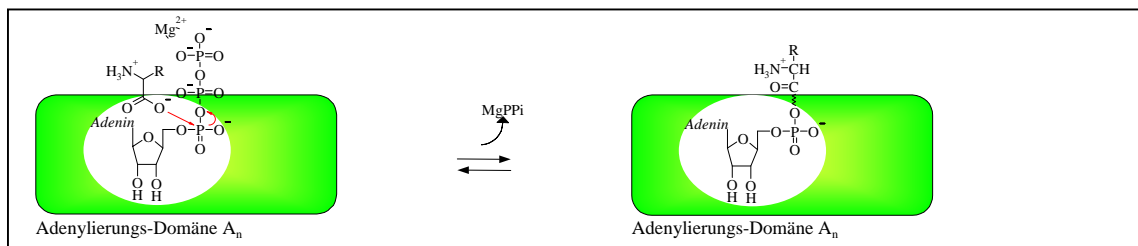


Abb. 2.4: Adenylierung. Die Adenylierung repräsentiert die erste Stufe der Aminosäureaktivierung während der nichtribosomalen Peptidsynthese. Dabei katalysieren die A-Domänen die spezifische Erkennung und Aktivierung der Substrataminosäuren als enzymgebundene Aminoacyladenylate unter Spaltung von ATP.

Es wurde bereits erwähnt, daß die Mehrzahl der hochkonservierten Sequenzmotive der A-Domänen an der Bindung und Hydrolyse von ATP beteiligt sind. Erwartungsgemäß wurden daher die meisten der hochkonservierten Sequenzmotive A1 bis A10 (Abb. 2.3 und Tab. 2.1) in unmittelbarer Umgebung des aktiven Zentrums gefunden (Stachelhaus et al., 1999). Dagegen wird die Aminosäurespezifität von einem Bereich mit geringer Sequenzhomologie determiniert, einem kurzen Bereich von etwa 100 Aminosäureresten zwischen den Motiven A4 und A5. Bereits 1997 stellten Conti et al. die These auf, daß die Substratspezifität der A-Domänen hauptsächlich durch den Charakter von zehn Aminosäuren der Substratbindungstasche festgelegt wird (Conti et al., 1997). Stachelhaus et al. bestätigten diese Schlüsselpositionen durch den Vergleich der PheA-Bindungstasche mit den entsprechenden Sequenzen von 160 weiteren A-Domänen und entwarfen darüber hinaus allgemeine Regeln für die sich aus diesen Aminosäurepositionen ableitende Substratspezifität (Stachelhaus et al., 1999). Gemäß dieser Definition bilden vermutlich die zehn Aminosäuren in den Positionen 235, 236, 239, 278, 299, 301, 322, 330, 331 und 517 (Numerierung entsprechend der PheA-Sequenz) den sogenannten nichtribosomalen Code, in Anlehnung an die Basentriplets des ribosomalen Proteinsynthesystems. Erste Mutationsexperimente an verschiedenen A-Domänen der Gramacidin S-Synthetase scheinen diese Theorie zu bestätigen (Stachelhaus et al., 1999). Diese Aminosäure-Codons bieten damit einerseits die Möglichkeit, die Substratspezifitäten noch unbekannter Peptidsynthetasen vorherzusagen, und andererseits die

Aminosäuresequenz des fertigen Peptids gezielt durch wenige Mutationen in der Bindungstasche zu verändern (von Döhren et al., 1999; Stachelhaus et al., 1999).

2. 3. 2 Die Thiolations-Domäne

Mit Ausnahme solcher Module, die eine N-methylierte Aminosäure aktivieren, schließt sich unmittelbar an die A-Domäne eine Thiolations-Domäne (T-Domäne; Abb. 2.3, blau) an, die aus durchschnittlich 75 Aminosäureresten besteht und aufgrund ihrer Homologien zu den Acyl-Carrier-Proteinen (ACP) der Fettsäure- und Polyketid-Synthasen ebenfalls als Peptidyl-Carrier-Protein (PCP) bezeichnet wird (Marahiel et al., 1997b; Weber, T. et al., 2000). Obwohl die PCPs als integrierte funktionelle Domänen von modularen Enzymsystemen agieren, konnte kürzlich durch *in vitro*-Phosphopantetheinylierung und *in trans*-Aminoacylierung gezeigt werden, daß sie ebenso als eigenständige Enzyme wirken können (Stachelhaus et al., 1996; Quadri et al., 1998; Weinreb et al., 1998). Sowohl die ACP- als auch die PCP-Domäne verfügen über das hochkonservierte Motiv D(D/N)FFxLGGHS(L/I) (Tab. 2.1; Motiv T), dessen invariantes Serin für die kovalente Bindung des 4'-PP-Cofaktors verantwortlich ist. Erst vor kurzem wurde die 3-D-Struktur einer PCP-Domäne gelöst, bei der die exakten Begrenzungen zu den Nachbardomänen lokalisiert werden konnten. Demnach beginnt die PCP-Domäne 37 Aminosäuren vor dem konservierten Serin und endet nach ca. 37 weiteren Aminosäuren (Weber, T. et al., 2000).

Die katalytische Funktion der PCP-Domänen setzt eine posttranslationale Modifikation voraus, bei der die inaktiven Apo-Proteine durch den Transfer der 4'-PP-Gruppe eines CoA-Moleküls zu der Hydroxyl-Seitenkette des konservierten Serin-Restes in ihre aktive Holo-Form konvertiert werden (Abb. 2.5; Lambalot et al., 1996).

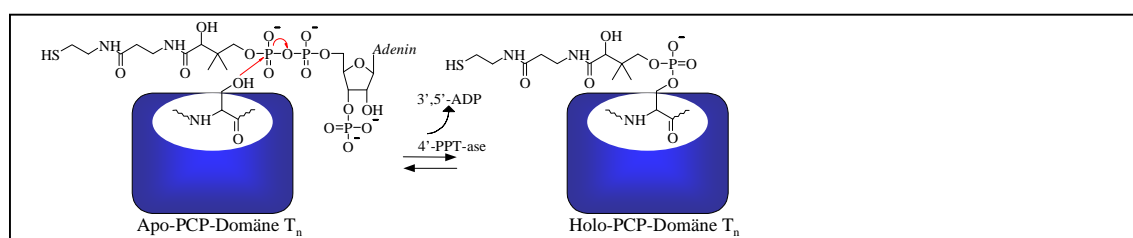


Abb. 2.5: Posttranslationale Phosphopantetheinylierung der PCP-Domäne. Unter Beteiligung einer 4'-Phosphopantetheinyl-Transferase (4'-PPT-ase) erfolgt die für die katalytische Aktivität essentielle Konversion der inaktiven Apo-PCP-Domäne in ihre Holo-Form. Die Übertragung des 4'-PP-Cofaktor auf die PCP-Domäne resultiert dabei aus dem nukleophilen Angriff der Hydroxyl-Seitenkette des invarianten Serin-Restes in der PCP-Kernsequenz (Tab. 2.1) auf die β -Phosphatgruppe eines CoA-Moleküls.

Katalysiert wird die Beladung von den 4'-Phosphopantetheinyltransferasen (4'-PPT-ase), die erstmals 1996 von Lambalot et al. beschrieben wurden (Lambalot et al., 1996) und zu denen die durch *sfp* und *gsp* kodierten Proteine Sfp und Gsp gehören (Abb. 2.2a und b). Beide Gene sind zwar mit den für die Surfactin- bzw. Gramacidin S-Synthese verantwortlichen

bakteriellen Operons *srfA* und *grs* verknüpft, aber nicht darin integriert (Marahiel et al., 1997b).

Während der zweiten Stufe der Substrataktivierung, der Aminoacylierung, werden die Aminosäuren als energiereiche Aminoacylthioester gebunden, bei denen die durch die 4'-PPT-ase an die PCP-Domänen fixierten Thiolgruppen die Thioester-Bindungsstellen für die Aminosäuresubstrate repräsentieren (Abb. 2.6). Jedes Aminosäure-aktivierende Modul verfügt dabei über einen eigenen an den konservierten Serin-Rest gebundenen Phosphopantetheinarm, der die Peptidelongation zu dem jeweiligen Nachbarmodul vermittelt (von Döhren et al., 1997; Mootz and Marahiel, 1997a).

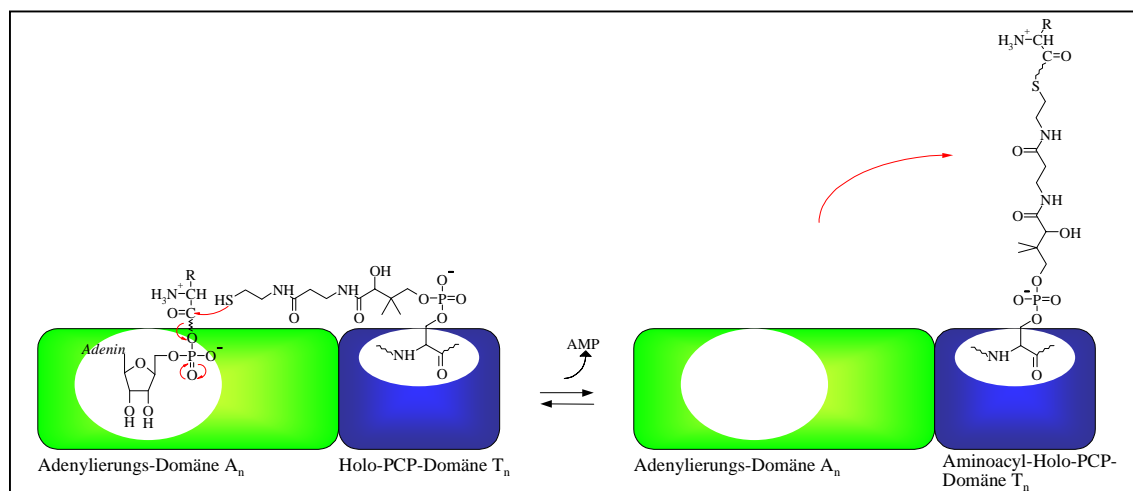


Abb. 2.6: Aminoacylierung der Holo-PCP-Domäne. In der zweiten Stufe der Substrataktivierung wird das enzymgebundene instabile Aminoacyladenylat (Abb. 2.4) kovalent als Aminoacylthioester gebunden. Dabei fungiert die posttranslational eingeführte Thiolgruppe (Abb. 2.5) des 4'-PP-Cofaktors als Nukleophil.

2. 3. 3 Die Kondensations-Domäne

Für die schrittweise Elongation der wachsenden Peptidkette ist ein dritter Domänen-Typ essentiell: die Kondensations-Domänen (engl. *condensation*; C-Domänen; Abb. 2.3, rot). Sie bestehen aus durchschnittlich 450 Aminosäureresten und befinden sich generell am Aminoterminalen Ende jener Synthetase-Module, die die Übernahme der Acyl- bzw. Peptidylgruppen des vorhergehenden Moduls katalysieren (Elongationsmodule; Abb. 2.3). Dementsprechend fehlen sie in solchen Modulen, die für die Aktivierung der ersten Aminosäure verantwortlich sind (Initiationsmodule; Abb. 2.3; Konz and Marahiel, 1999a).

Über die Rolle der C-Domänen wurde lange Zeit nur spekuliert und die Interpretation als simple Spacer-Domäne schied bereits aufgrund ihrer Größe aus (Marahiel et al., 1997b). Erst 1995 gelang de Crécy-Lagard et al. der Nachweis, daß die C-Domäne mit dem hochkonservierten Motiv HHIIxDGVS (Tab. 2.1; C3 = His-Motiv) maßgeblich an der Elongationsreaktion beteiligt ist (de Crécy-Lagard et al., 1995). Bei dem vorgeschlagenen Mechanismus ermöglicht die Deprotonierung der Akzeptor-Aminosäure durch den zweiten

invarianten Histidin-Rest den nukleophilen Angriff auf den Aminoacylthioester der vorhergehenden Aminosäure (de Crécy-Lagard et al., 1995). De Crécy-Lagard et al. identifizierten dieses His-Motiv ebenso in Epimerisierungs-Domänen, wo vermutlich ebenfalls der zweite konservierte Histidin-Rest in die Katalyse involviert ist (de Crécy-Lagard et al., 1995). Die Epimerisierungs-Domänen werden in Kapitel 2.3.5 noch ausführlicher beschrieben.

Nach neueren Untersuchungen lassen sich die C-Domänen weiter in einen Donor- und einen Akzeptorteil differenzieren (Belshaw et al., 1999; Linne and Marahiel, 2000), in deren Konsequenz für die Peptidelongation ein „3-Site-Modell“ etabliert wurde, bei dem die ursprüngliche Vorstellung des direkten Aminosäuretransfers zwischen den benachbarten Cofaktoren korrigiert wurde (Abb. 2.7). Demzufolge nehmen die Phosphopantetheinarme (mit Ausnahme des Initiationsmoduls) vermutlich drei verschiedene Konfigurationen ein: Beladungs-, Akzeptor- und Donorkonfiguration (Belshaw et al., 1999).

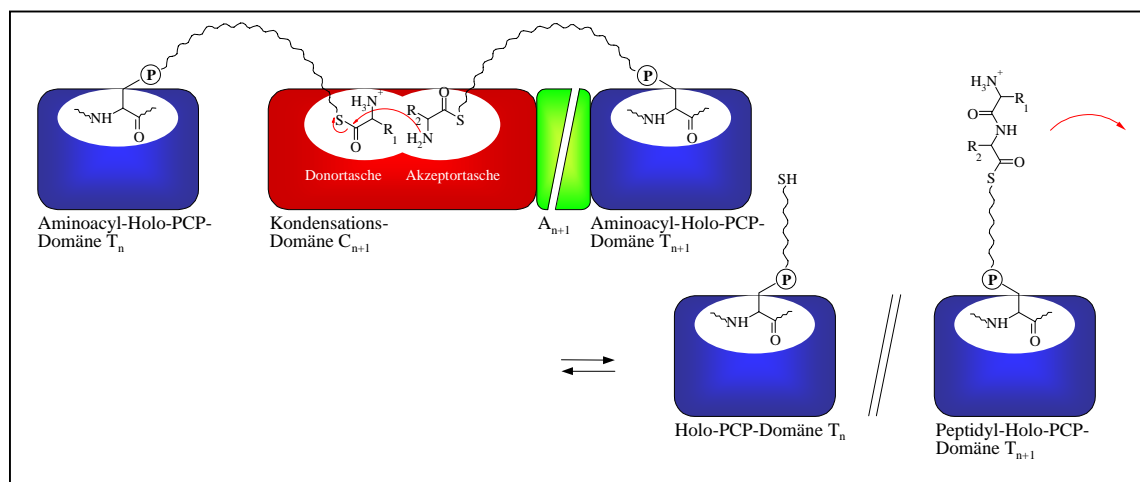


Abb. 2.7: Peptidelongation (Transpeptidierung). Während der schrittweisen Peptidelongation fungieren die an die invarianten Serin-Reste der PCP-Domänen fixierten Cofaktoren als Schwingungsarme, die die wachsende Peptidkette von Cofaktor zu Cofaktor weiterreichen. Der mit der (n+1)-ten Aminosäure beladene Akzeptorarm reicht stromaufwärts über die A-Domäne zur Akzeptortasche und wartet auf die Ankunft des mit der Aminoacyl- (oder Peptidyl-)Gruppe beladenen Donorarmes des n-ten Moduls. Infolge des nukleophilen Angriffs der α -Aminogruppe der Akzeptor-Aminosäure auf den Carbonyl-Kohlenstoff der Donor-Aminosäure kommt es zur Ausbildung einer Peptidbindung. Der um eine Aminosäure erweiterte Peptidyl-4'-PP-Arm verläßt die Akzeptortasche und schwingt zur Donortasche der folgenden C-Domäne, um mit dem nächsten Aminoacylrest zu reagieren.

Nach der wahrscheinlich parallelen Beladung der 4'-PP-Cofaktoren mit den entsprechenden Aminosäuren reicht der rechtsseitige Aminoacyl-4'-PP-Arm stromaufwärts über die A-Domäne hinweg zu der Akzeptortasche und wartet dort auf das Eintreffen des Donorarmes der vorigen PCP-Domäne in die Donortasche. Unter dem Einfluß des basisch wirkenden Histidin-Restes aus dem stark konservierten His-Motiv kommt es zur Ausbildung einer Peptidbindung. Im weiteren Verlauf verläßt der gebildete Peptidyl-4'-PP-Arm die Akzeptortasche und schwingt zur Donortasche des Folgemoduls, wo bereits der nächste Aminoacyl-Akzeptorarm wartet. Der nunmehr unbeladene Donorarm kehrt für einen neuen Reaktionszyklus in seine Ausgangsstellung zurück (Abb. 2.7; Belshaw et al., 1999; Linne and Marahiel,

2000). Das Kettenwachstum erfolgt nach dem gleichen Prinzip bis die letzte C-Domäne erreicht wird. Dabei entspricht die Anzahl der C-Domänen genau der Anzahl der geknüpften Peptidbindungen im linearen Intermediat (Marahiel et al., 1997b).

Wie bereits angesprochen unterscheiden sich Initiationsmodule von den restlichen Modulen durch das Fehlen der N-terminalen C-Domäne. Demzufolge wird die aktivierte Aminosäure sofort zur Donortasche der nächsten C-Domäne weitertransportiert und initiiert dadurch den Peptidelongationsprozeß (de Crécy-Lagard et al., 1995; Mootz and Marahiel, 1997a). Im Gegensatz zu Initiationsmodulen sind Elongationsmodule nicht in der Lage, die Peptidbildung auszulösen. Die Erklärung liegt in der Enantioselektivität der Akzeptor-Site, die wie erst kürzlich durch Linne und Marahiel gezeigt wurde, eine Misinitiation durch die innenliegenden Elongationsmodule verhindert (Linne and Marahiel, 2000).

2. 3. 4 Integrierte und assoziierte Thioesterasen

Die Existenz einer integrierten Thioesterase-Domäne (TE-Domäne; Abb. 2.3, orange) ist charakteristisch für alle bakteriellen sowie einige fungale NRPS-Module, die die Ablösung des fertiggestellten Peptids vom Proteintemplate katalysieren, wie z.B. bei SrfA-C, GrsB, TycC und ACV (Abb. 2.2). Sie besteht aus durchschnittlich 250 Aminosäureresten und befindet sich ausschließlich am C-terminalen Ende der modularen Enzyme (Schneider and Marahiel, 1998b). Aufgrund ihrer Lokalisierung und den starken Sequenzhomologien zu den Typ I Thioesterasen der Polyketid- und Fettsäuresynthese wird vermutet, daß sie für die Termination der nichtribosomalen Peptidsynthese und die Freisetzung des fertigen Peptids verantwortlich sind (de Ferra et al., 1997; Marahiel et al., 1997b). Den experimentellen Beweis für die direkte Beteiligung an der nichtribosomalen Peptidsynthese erbrachten Schneider und Marahiel sowie de Ferra et al. anhand von Deletionsstudien am Beispiel der Surfactin-Synthetase, bei denen die Entfernung der integrierten TE-Domäne zum fast vollständigen Ausfall der Surfactin-Produktion führte (de Ferra et al., 1997; Schneider and Marahiel, 1998b). Darüber hinaus demonstrierten de Ferra et al., daß die Synthese kürzerer Peptide durch Verschiebung der TE-Domäne an das Carboxy-terminale Ende eines vorderen Moduls prinzipiell möglich ist (de Ferra et al., 1997).

Die TE-Domänen verfügen ein charakteristisches GxSxG-Motiv (Tab. 2.1; TE-Motiv), dessen stark konservierter Serin-Rest vermutlich die Bindungsstelle für das fertiggestellte lineare Peptidintermediat repräsentiert (Cane et al., 1998; Kallow et al., 2000). Es wird angenommen, daß die Peptidkette nach Erreichen der letzten PCP-Domäne zunächst kovalent an die Hydroxylgruppe des Serin-Restes gebunden wird, bevor sie endgültig vom Enzym abgespalten wird. Dabei erfolgt die Spaltung der Thioesterbindung entweder durch einen intermolekularen Angriff durch Wasser (Hydrolyse) oder einen intramolekularen Angriff durch eine funktionelle Gruppe aus der Acylkette selbst. Im ersten Fall ist das resultierende Produkt ein lineares Peptid, wie z.B. Aminoadipyl-cysteinyl-valin von der ACV-Synthetase.

Im zweiten Fall entstehen entweder durch die Reaktion mit der α -Aminogruppe der Start-aminosäure cyclische (z.B. Gramicidin S, Tyrocidin A) oder durch die Reaktion mit einer Hydroxyl- oder Aminogruppe aus der Peptidseitenkette verzweigt cyclische Peptide (z.B. Surfactin, Bacitracin; Cane et al., 1998).

Zusätzlich zu den integrierten TE-Domänen verfügen zahlreiche bakterielle NRPS über eine zweite Thioesterase, die von einem separaten Gen innerhalb des Bakterienoperons kodiert wird (Schneider and Marahiel, 1998b). Im Gegensatz zu den räumlich invarianten, integrierten TE-Domänen befinden sich die assoziierten Thioesterasen sowohl am N- (z.B. GrsT) als auch am C-terminalen Ende (z.B. SrfA-TE, Tyc-TE) der NRPS (Abb. 2.2a-c; Krättschmar et al., 1989; Cosmina et al., 1993; Mootz and Marahiel, 1997b). Die 25-29 kDa großen Proteine weisen starke Ähnlichkeiten mit den Typ II Thioesterasen der Fettsäure-Synthasen auf (Konz and Marahiel, 1999a) und enthalten ebenfalls das Thioesterase-Motiv GxSxG. Über die Funktion dieser zusätzlichen Thioesterasen herrscht bisher noch keine Klarheit (de Ferra et al., 1997; Konz and Marahiel, 1999a). Etliche Untersuchungen deuten darauf hin, daß sie für die Freisetzung der Peptide nicht essentiell sind, jedoch spricht die drastische Reduktion (84 %) der *in vivo* Surfactin-Produktion nach der Deletion der Thioesterase SrfA-TE für deren direkte Beteiligung an der nichtribosomalen Peptidsynthese (Schneider and Marahiel, 1998b). Schneider und Marahiel vermuten die Bedeutung dieser Enzyme in der Regeneration misbeladener Module, die infolge inkorrekturer Aminoacylierung der 4'-PP-Cofaktoren blockiert sind (Schneider and Marahiel, 1998b).

2. 3. 5 Modifizierende Domänen

Peptidsynthetase-Module können zusätzlich zu den für die Peptidbindung und Termination essentiellen Domänen weitere funktionelle Abschnitte enthalten, die die Modifizierung der aktivierten Aminosäure katalysieren und damit die Vielfalt der nichtribosomal synthetisierten Peptide enorm steigern. Dazu gehören Epimerisierungs- und N-Methylierungs-Domänen, die im folgenden Kapitel kurz dargestellt werden sollen.

Mit wenigen Ausnahmen weisen alle Module, die der Peptidkette eine D-Aminosäure hinzufügen, eine Epimerisierungs-Domäne auf (E-Domäne; Abb. 2.3, gelb). Die etwa 400 Aminosäuren umfassende Region grenzt an das C-terminale Ende der PCP-Domäne und enthält mehrere charakteristische Kernsequenzen (E1 bis E7), darunter das ebenfalls in den C-Domänen vorhandene His-Motiv (Tab. 2.1; E2 = His-Motiv; de Crécy-Lagard et al., 1995; Marahiel et al., 1997b). Es scheint sicher, daß dieses His-Motiv auch innerhalb der E-Domänen das katalytische Zentrum darstellt, dessen zweiter Histidin-Rest die Abstraktion des C α -Protons des an den 4'-PP-Cofaktor gebundenen Aminoacyl- oder Peptidylsubstrates katalysiert (de Crécy-Lagard et al., 1995; Stachelhaus and Walsh, 2000).

Es sind jedoch auch einige Module bekannt, die zwar eine D-Aminosäure in die Peptidkette einfügen, denen aber die Epimerisierungs-Domäne fehlt, wie z.B. bei der

Cyclosporin A- (Abb. 2.2e) und der Syringomycin-Synthetase. Da derartige Module nicht in der Lage sind, die entsprechenden L-Aminosäuren zu isomerisieren, ist in diesen Fällen eine externe Racemase in die nichtribosomale Peptidsynthese involviert (Konz and Marahiel, 1999a). Die A-Domänen dieser Module aktivieren dann spezifisch die D-konfigurierten Aminosäuren. Beispielsweise identifizierten Hoffmann et al. eine spezifische Alanin-Racemase, die bei der Cyclosporin A-Synthese eine Schlüsselfunktion einnimmt, da sie die Startaminosäure D-Alanin bereitstellt (Hoffmann et al., 1994).

Eine weitere Möglichkeit zur Modifizierung der inkorporierten Aminosäuren ist die N-Methylierung, die von der etwa 420 Aminosäuren umfassenden N-Methylierungs-Domäne (M-Domäne; Abb. 2.3, grau) katalysiert wird. Dabei existiert für jede methylierte Aminosäure eine separate M-Domäne, beispielsweise enthält die Cyclosporin A-Synthetase (Abb. 2.2e) sieben und die Enniatin-Synthetase eine M-Domäne (Haese et al., 1993; Weber, G. et al., 1994). Die Domänen befinden sich zwischen der A- und der PCP-Domäne und enthalten drei charakteristische Sequenzmotive (Tab. 2.1; Motive M1 bis M3), einschließlich der Glycinreichen Sequenz VL(E/D)xGxGxG (Konz and Marahiel, 1999a). Aufgrund der Homologien zu anderen N-Methyltransferasen wird angenommen, daß dieses Motiv die Bindungsstelle für den Methyl-Donor S-Adenosylmethionin (SAM) repräsentiert (Pieper et al., 1995; Konz and Marahiel, 1999a). Anhand biochemischer Studien konnte gezeigt werden, daß die Modifizierung in der Thioesterstufe, jedoch vor der Peptidbindung stattfindet (Pieper et al., 1995; Weckwerth et al., 2000).

2. 4 Die Surfactin-Synthetase

Aufgrund ihrer modularen Organisation verfügen die NRPS über ein enormes Potential für die Synthese neuartiger bioaktiver Peptide. Als eines der meistuntersuchten nichtribosomalen Biosynthesesysteme hat sich die Surfactin-Synthetase seither zu einem Modellsystem des Antibiotika-Engineerings etabliert.

Surfactin ist ein cyclisches Lipoheptapeptid, das in der späten exponentiellen Phase von verschiedenen *Bacillus subtilis*-Stämmen als ein Gemisch verschiedener Isoformen gebildet wird. Dessen Hauptkomponente Surfactin A besteht aus den sieben Aminosäuren ¹L-Glu → ²L-Leu → ³D-Leu → ⁴L-Val → ⁵L-Asp → ⁶D-Leu → ⁷L-Leu, die mit einer β-Hydroxyfettsäure variabler Kettenlänge (13 bis 16 C-Atome) zu einem Lactonring verknüpft sind (Abb. 2.1 und 2.8b; Ullrich et al., 1991). In Abhängigkeit vom Fermentationsmedium werden verschiedene Strukturanaloga gebildet, bei denen hauptsächlich die L-Leucin-Reste in den Positionen 2 und 7 durch L-Valin oder L-Isoleucin bzw. L-Valin in der Position 4 durch L-Leucin, L-Isoleucin oder L-Alanin ersetzt sein können (Baumgart et al., 1991; Peypoux and Michel, 1992; Kowall et al., 1998). Surfactin ist eines der effizientesten Biotenside, besitzt antifungale und antitumorale Eigenschaften, inhibiert die Blutgerinnung und weist die

Fähigkeit auf Erythrocyten und verschiedene bakterielle Protoplasten zu lysieren (Baumgart et al., 1991; Ullrich et al., 1991)

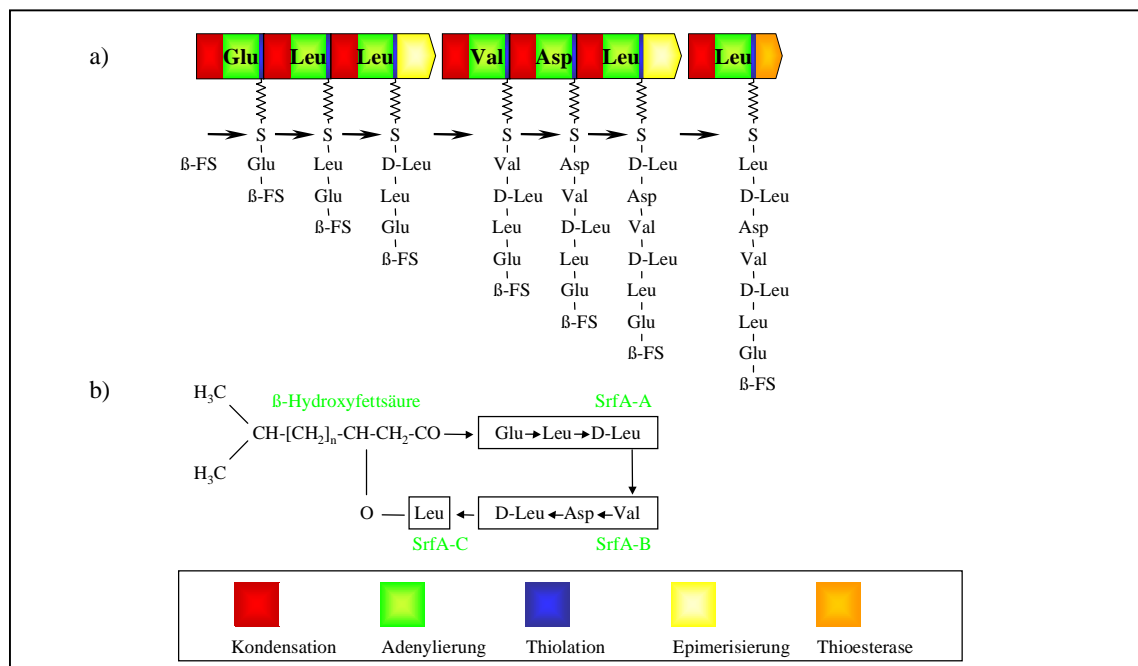


Abb. 2.8: Der Multienzym Thiotemplate Mechanismus am Beispiel der Surfactin-Biosynthese

Für die Biosynthese des amphiphilen Lipopeptids ist die Surfactin-Synthetase verantwortlich (Abb. 2.8a). Sie besteht aus sieben Aminosäureaktivierungsmodulen, die in zwei trimodularen (SrfA-A, SrfA-B) und einem monomodularen Multienzymkomplex (SrfA-C) organisiert sind und den schrittweisen Einbau der Substrataminosäuren in die Peptidkette katalysieren. Innerhalb dieser Module wurden sämtliche an der Peptidsynthese beteiligten Strukturmodule nachgewiesen, einschließlich der Aminosäureadenylierung, Thioesterbindung und Peptidelongation (Kapitel 2. 3). Darüber hinaus endet die Polypeptidkette der beiden trimodularen Enzyme SrfA-A und SrfA-B jeweils mit einer E-Domäne, die für die Transformation des dritten bzw. sechsten L-Leucins in dessen D-Konfiguration verantwortlich ist (Kapitel 2. 3. 5). In beiden Fällen befindet sich die nächste C-Domäne auf einer neuen Untereinheit. Die dritte, monomodulare Surfactin-Synthetase SrfA-C katalysiert den Einbau der letzten Aminosäure L-Leucin in die Peptidkette. Sie trägt am C-terminalen Ende eine integrierte TE-Domäne, die nachweislich in die *in vivo* Surfactin-Produktion involviert ist (Kapitel 2. 3. 4; de Ferra et al., 1997; Schneider and Marahiel, 1998b).

Die Surfactin-Synthetase wird von dem 27 kb umfassenden *srfA*-Operon kodiert, das aus den vier offenen Leserastern *srfAORF1* (*srfA-A*), *srfAORF2* (*srfA-B*), *srfAORF3* (*srfA-C*) und *srfAORF4* (*srfA-TE*), besteht. (Abb. 2.2a; Cosmina et al., 1993; Fuma et al., 1993). Dabei kodieren die Gene *srfA-A*, *srfA-B* und *srfA-C* für die drei zur Surfactin-Synthese erforderlichen Multienzymkomplexe SrfA-A, SrfA-B und SrfA-C (402, 401 und 144 kDa),

während das vierte Gen *srfA-TE* für ein Thioesterase-ähnliches Protein von ca. 25 kDa Größe kodiert.

Die Biosynthese des Lipopeptids Surfactin verläuft nach dem in Kapitel 2. 2 beschriebenen Multienzym Thiotemplate Mechanismus, bei dem die aktivierten Aminosäuren durch eine Reihe gerichteter Transpeptidierungsreaktionen zu einem linearen Peptidintermediat verknüpft werden (Abb. 2.8a). Dabei verfügt jedes Aktivierungsmodul über einen eigenen 4'-PP-Carrier, der kovalent an die Hydroxylgruppe eines invarianten Serin-Restes gebunden ist und so die Peptidelongation zwischen den Nachbarmodulen vermittelt. Verantwortlich für die posttranslationale Phosphopantetheinylierung und damit die Herstellung der katalytischen Aktivität der Surfactin-Synthetase ist das Sfp-Protein, welches zur Familie der 4'-PPT-asen zählt und durch ein separates, mit dem *srfA*-Operon assoziiertes Gen kodiert wird (Abb. 2.2a und 2.5; Kapitel 2. 3. 2). Neben den sieben homologen Modulen und dem Sfp-Protein ist eine Acyltransferase an der Surfactin-Synthese beteiligt. Dieses etwa 40 kDa große Enzym initiiert die Biosynthese des Lipopeptids durch die Übertragung der Fettsäurekomponente zu dem ersten Aminosäureaktivierungsmodul unter Bildung eines β -Hydroxyacylglutamat-Intermediates. Jedoch konnte das Gen, das für dieses Polypeptid kodiert, bislang nicht identifiziert werden.