

1 Einleitung und Problemstellung

Der Begriff Antibiotika wurde 1941 von Selman Waksman erstmals definiert und umfaßte ursprünglich ausschließlich Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen, die in bereits geringer Konzentration das Wachstum anderer Mikroorganismen hemmen (Bakteriostatika) oder sie gar abtöten (Bakterizide). Inzwischen wurde die Definition erweitert und schließt nunmehr auch chemisch modifizierte als auch rein synthetisch hergestellte Verbindungen mit ein (Levy, 1998; Walsh, 2000).

Schon seit Beginn des therapeutischen Antibiotikaeinsatzes entwickelten die Bakterien effektive Resistenzmechanismen, die meist im Zeitraum weniger Monate bis Jahre nach der Einführung des Antibiotikums auftreten. So wurden Penicillin-Resistenzen bereits zwei Jahre nach dessen Einführung Mitte der vierziger Jahre registriert (Walsh, 2000). Mittlerweile hat die Resistenzentwicklung solche Ausmaße angenommen, daß bei diversen pathogenen Bakterienstämmen sämtliche verfügbaren Antibiotika versagen, u.a. bei einigen Stämmen von *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* und *Mycobacterium tuberculosis* (Levy, 1998). Resistenzgene existieren teilweise natürlich und werden direkt an die Folgegenerationen weitergegeben, ebenso werden sie durch Mutationen erworben. Eine zentrale Rolle bei der raschen Ausbreitung der Antibiotikaresistenzen nehmen aber die Resistenzgene ein, die auf Plasmiden gesammelt und zwischen verschiedenen Bakterienspezies regelrecht getauscht werden (Levy, 1998).

Seit ihrer Entdeckung sind Antibiotika zu verlässlichen Werkzeugen bei der Bekämpfung gefährlicher Infektionskrankheiten geworden. Um diese auch noch in Zukunft wirksam behandeln zu können, ist es unbedingt erforderlich, der Resistenzentwicklung mit entsprechenden Strategien entgegenzuwirken. Prinzipiell kommen dafür zwei Lösungswege in Frage. Der direkte Weg führt dabei über die Entwicklung spezifischer Inhibitoren, die die Resistenzmechanismen unterdrücken und so den Wert vorhandener Wirkstoffe erhalten. Beispielsweise ist es bereits möglich, sowohl β -Lactamasen als auch Membranpumpen mit derartigen Substanzen auszuschalten (Walsh, 2000). Der zweite, indirekte Weg beinhaltet dagegen die Errichtung neuer, umfangreicher Substanzbibliotheken, bei der durch zahllose Ausweichvarianten der Resistenzentwicklung bereits im Vorfeld vorgebeugt wird. Dabei beschränkt sich die Suche nicht allein auf das Screening bisher unbekannter Naturstoffe, vielmehr bedient man sich bei der Erschließung neuer Antibiotikaquellen der gezielten Veränderung vorhandener Wirkstoffe durch die genetische Manipulation der Antibiotika-Produzenten. So werden zahlreiche bioaktive Sekundärmetaboliten auf nichtribosomalem Wege von riesigen Multienzymkomplexen, den Nichtribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS), synthetisiert. Diese besitzen einen verhältnismäßig einfachen, modularen Aufbau, der bei der Entwicklung innovativer Wirkstoffe, insbesondere von durch chemische Synthesen schwer oder gar nicht zugänglichen komplexen Verbindungen, völlig neue Dimensionen eröffnet.

Jedoch sind für das Design neuer Peptidantibiotika umfassende Kenntnisse über die Struktur und Funktionen der katalytischen Domänen sowie deren Zusammenspiel untereinander unerlässlich. Denn obgleich das spezifische Engineering der NRPS ein vielversprechendes Verfahren zur Darstellung neuartiger Peptide darstellt, scheiterten in der Vergangenheit die meisten Ansätze letztlich an der Aufhebung interdomänischer Wechselwirkungen. Erklärtes Ziel dieser Arbeit war es daher, eben diese Wissenslücke zu schließen und geeignete Fusionsstellen für die biokombinatorische Verknüpfung der NRPS zu lokalisieren.

Als Träger der Substratspezifität bilden die Adenylat-Domänen (A-Domänen) das Herzstück aller Peptidsynthetase-Module. Der erste Teil der Arbeit widmete sich daher der Charakterisierung der Adenylierungsfunktion von zwei Mitgliedern der adenylatbildenden Familie. Zum einen wurde dafür als eigenständig arbeitendes Enzym die Acetyl-CoA-Synthetase aus *Lysobacter sp.* ATCC 53042 ausgewählt, bei der insbesondere die substratabhängigen Unterschiede der zweistufigen Carbonsäureaktivierung herausgearbeitet werden sollten. Zum anderen sollte das Glutaminsäure-aktivierende Modul der Surfactin-Synthetase SrfA-A aus *Bacillus subtilis* ATCC 21332 eingehend untersucht werden. Von besonderem Interesse waren hierbei vor allem der Einfluß N- und C-terminaler Deletionen. Angeregt durch die 3-D-Strukturen zweier verwandter Proteine wurde dieses Modul außerdem für ausgiebige Kristallisationsversuche ausgewählt, von denen wichtige strukturelle Hinweise erwartet wurden.

Vor dem Hintergrund des zentralen Anliegens der Arbeit, der systematischen Untersuchung des Protein-Engineerings von Antibiotika-Synthetasen, umfaßte die nächste Stufe die genetische Manipulation der Surfactin-Synthetase-Gene. Dazu sollten die kodierenden Regionen verschiedener Surfactin-Synthetase-Module neu miteinander rekombiniert werden, wobei der prinzipielle Modul-Bauplan jedoch beibehalten werden sollte. Um dabei ein möglichst umfassendes Bild über die interdomänischen Wechselwirkungen zu erhalten, mußten die Fusionsstellen über alle drei an der Aminosäureaktivierung und Peptidelongation beteiligten Domänen A, T (Thiolation) und C (Kondensation) verteilt werden. Mit Ausnahme der beabsichtigten Funktionsänderungen, wie z.B. der Substratspezifität, durften die übrigen Enzymfunktionen der betroffenen Domänen von diesen Manipulationen nicht beeinträchtigt werden. Inwiefern sich die gewählten Fusionsstellen für die genetische Neukombination der NRPS eigneten, sollte mit Hilfe ausführlicher Aktivitätsuntersuchungen (ATP-PP_i-Austausch, Thioesterbeladung, Peptidsynthese) geprüft werden.

Den Beginn des Modul-Swappings bildeten monomodulare Hybridenzyme zwischen dem Valin-aktivierenden Modul Srf-M4 und dem Leucin-aktivierenden Modul Srf-M7, bei denen die C-terminalen Regionen reziprok gegeneinander ausgetauscht werden sollten. Vor allem war dabei die Frage zu klären, durch welchen Abschnitt die Substratspezifität festgelegt wird. Darauf aufbauend sollten die Untersuchungen anschließend auch auf bimodulare Systeme ausgeweitet werden, die durch Deletion eines größtmäßig dem mittleren Leucin-

aktivierenden Modul Srf-M2 entsprechenden Arealen von der trimodularen Surfactin-Synthetase SrfA-A hergestellt werden sollten. Hierzu mußten sämtliche Konstrukte einschließlich aller Wildtypenzyme wie auch die für die Bestimmung der Thioesterbeladung benötigte 4'-Phosphopantetheintransferase Sfp heterolog in *E. coli* exprimiert und aufgereinigt werden.

Im Verlauf der Untersuchungen zeigte sich jedoch, daß *in vitro* nur zwei (Adenylierung und Thiolierung) der drei katalytischen Reaktionen nachzuweisen waren. Für die Beurteilung der Peptidbindungsreaktion mußten die genetischen Manipulationen beim Wildtyp-Surfactin-Produzenten selbst vorgenommen werden. Diese Herangehensweise bot den Vorteil, daß der Erfolg der verschiedenen Rekombinationsstrategien unmittelbar an der *in vivo*-Biosynthese der modifizierten Peptidantibiotika abzulesen war. Hierzu sollten die aussichtsreichsten Kandidaten des vorhergehenden Abschnitts ausgewählt und in *B. subtilis* ATCC 21332 transformiert werden. Die Charakterisierung der rekombinanten Surfactin-Synthetasen einschließlich ihrer Produkte sollte den Abschluß dieser Arbeit bilden.