

## 6 Diskussion

Das isolierte AcsL-Protein aus *Lysobacter sp.* ATCC 53042 konnte als Mitglied der Acetyl-CoA-Synthetase-Familie klassifiziert werden. Verglichen mit verwandten Enzymen anderer gramnegativer Bakterien (Blattner et al., 1993; Priefert and Steinbüchel, 1992) oder sogar filamentöser Pilze (Connerton et al., 1990; Garre et al., 1994; Gouka et al., 1993; Sandeman and Hynes, 1989) besitzt es jedoch einige Besonderheiten: zum einen ist es etwa 20 bis 40 Aminosäuren kleiner als die meisten anderen Acetyl-CoA-Synthetasen, zum anderen ist die Sequenzhomologie dieses Enzyms mit 53 bis 56 % geringer als die der übrigen Enzyme untereinander (65 %). Anscheinend hat sich das *acsL*-Gen schon früher von den restlichen pro- und eukaryotischen *acs*-Genen getrennt und separat entwickelt. Kaum Unterschiede weist es dagegen bei den Substrataffinitäten zu Acetat und ATP auf, sämtliche Bindungskonstanten lagen im gleichen Wertebereich wie die der Acetyl-CoA-Synthetasen von *Methanotherix soehngeni* (Jetten et al., 1989), *M. sp.* CALS-1 (Teh and Zinder, 1992), *Saccharomyces cerevisiae* (Frenkel and Kitchens, 1981) und *Penicillium chrysogenum* (Martinez-Blanco, 1992). Die Diskrepanz zwischen den Temperaturoptima des Wachstums und der Acetyl-CoA-Synthetase-Aktivität wurde auch schon bei anderen Organismen beschrieben (Teh and Zinder, 1992; Martinez-Blanco, 1992; Preston et al., 1990). Bisher konnte aber keine Erklärung für dieses Phänomen gefunden werden.

Allen Acetyl-CoA-Synthetasen liegt ein einheitlicher Ping-Pong-Aktivierungsmechanismus (Frenkel and Kitchens, 1981; Teh and Zinder, 1992) zugrunde, der sich auch in den enzymkinetischen Untersuchungen des AcsL-Proteins bestätigte. Demnach teilen sich ATP und CoA eine gemeinsame Enzymbindungsstelle, die durch überschüssiges CoA blockiert wird.

Entsprechend ihrer Fähigkeit, neben Acetat auch noch andere Carbonsäureanaloge zu erkennen und zu aktivieren, lassen sich die verschiedenen Acetyl-CoA-Synthetasen in zwei Gruppen einteilen. Zur ersten Gruppe zählen beispielsweise die Enzyme aus *M. soehngeni* (Jetten et al., 1989) und *M. sp.* CALS-1 (Teh and Zinder, 1992), die eine außerordentlich hohe Spezifität für Acetat besitzen und lediglich zu einem geringen Prozentsatz (etwa 5 %) auch Propionat akzeptieren. Dieser Gruppe ist auch die acetatspezifische Acetyl-CoA-Synthetase aus *Bradyrhizobium sp.* zuzuordnen (Preston et al., 1990). Aufgrund ihrer hohen Affinität zu Acetat wird vermutet, daß diese Enzymgruppe für dessen Assimilation verantwortlich ist (Teh and Zinder, 1992). Im Gegensatz dazu werden für die zweite Gruppe vielmehr anabolische Funktionen angenommen, wofür deren größere Carbonsäuretoleranz spricht. Beispielsweise stellt die Acetyl-CoA-Synthetase aus *P. chrysogenum* (Martinez-Blanco, 1992) die aktivierten Seitenketten-Precursoren für die Biosynthese von Benzylpenicillin G bereit und für das AcoE-Protein von *Alcaligenes eutrophus* (Priefert and Steinbüchel, 1992) wird eine Beteiligung an der Synthese von Poly-3-Hydroxyalkansäuren diskutiert. Charakteristisch für Enzyme dieser

Gruppe ist die vergleichsweise hohe Propionat-Aktivität, nach Acetat ist Propionat mit durchschnittlich 50 bis 60 % relativer Aktivität überwiegend das zweitbeste Substrat. Die nachgewiesenen Nebenaktivitäten des AcsL-Proteins mit Propionat und den restlichen Carbonsäurederivaten rechtfertigen dessen Eingruppierung in die zweite Gruppe. Es wäre denkbar, daß AcsL ähnlich wie das ACS-Protein von *P. chrysogenum* an der Bereitstellung von aktivierten Molekülen für die *in vivo*-Antibiotika-Produktion beteiligt ist. Allerdings weichen sowohl die Carbonsäure- als auch die Nukleotidspezifitäten zum Teil erheblich voneinander ab. Am auffälligsten ist dabei die hohe Akzeptanz des ATP-Analogons dATP durch das AcsL-Protein, die in diesem Ausmaß noch nie beschrieben wurde.

Bisher einmalig ist die detaillierte Charakterisierung der beiden Aktivierungsstufen der Acyl-CoA-Synthese mit Hilfe von drei verschiedenen Untersuchungsmethoden: (1) der Analyse der Adenylierungsreaktion anhand der ATP-Hydrolyse und der ATP-PP<sub>i</sub>-Austauschreaktion sowie (2) der Analyse der Acyl-CoA-Bildung mit Hilfe des Hydroxamattests. Zwischen den drei Reaktionen wurden bemerkenswerte Unterschiede festgestellt, die ihrerseits Rückschlüsse auf die Stabilität und Reaktivität der gebildeten Acyladenylate zuließen. So bewies die höchste Aktivität im ATP-PP<sub>i</sub>-Austausch mit dem Hauptsubstrat Acetat die starke Verlagerung des Adenylierungsgleichgewichts zugunsten der Ausgangssubstanzen Acetat und ATP. Stabiler als das Acetyladenylat war das Butyrylidenylat, aus der Reduktion der Rückreaktion bei gleichzeitiger Beschleunigung der ATP-Hydrolyse ergab sich insgesamt für die Akkumulation des Butyrylidenylates eine Verdreifachung gegenüber dem Acetylidenylat. Am robustesten waren die Adenylate mit Propionat und Isobutyrat. Deren Stabilität war so hoch, daß im ATP-PP<sub>i</sub>-Austausch überhaupt keine Reaktion mehr nachzuweisen war. Obwohl auch bei Lactat die Kohlenstoffhauptkette aus drei C-Atomen besteht, wurde eine derartige Anhäufung der Adenylatprodukte für keines der beiden Enantiomere festgestellt. Das ließ darauf schließen, daß die Stabilität nicht nur auf der Gesamtkettenlänge und der Größe der Seitenketten sondern auch auf der Hydrophobizität der Substituenten beruht.

Im Gegensatz zur Adenylierungsreaktion wurde bei der Analyse der Acyl-CoA-Bildung mit ATP eine stärkere Korrelation mit der Kettenlänge beobachtet, kontinuierlich mit jedem zusätzlichen C-Atom in der Hauptkette reduzierte sich die Acyl-CoA-Synthese um je ein Viertel. Darüber hinaus verstärkten zusätzliche Modifikationen der Carbonsäuren (funktionelle Gruppen, Verzweigung, Halogenaustausch) den Aktivitätsverlust gegenüber den geradkettigen, unmodifizierten Substraten. Trotz der starken Betonung der Rückreaktion während der Adenylierung wurde auch hier die höchste Aktivität mit dem Hauptsubstrat Acetat gemessen, was die hohe Reaktivität des Acetylidenylates unterstreicht und somit die Adenylatbildung als den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt definiert. Die Platzierung von Propionat als zweitbestes Substrat war vermutlich die Folge der hohen Adenylatstabilität, die kompensierend auf die geringe Geschwindigkeit der Adenylatbildung wirkte. Jedoch brachte die Steigerung der Adenylatstabilität nicht automatisch eine Zunahme der Acyl-CoA-

Synthese mit sich, wie die Untersuchung mit Butyrat zeigte. Ungeachtet der Verdreifachung der Intermediatausbeute verringerte sich die Geschwindigkeit der Butyryl-CoA-Synthese auf weniger als die Hälfte gegenüber dem Acetatvergleichswert. Anders als bei diesem bestimmte demnach die Umwandlung von Butyryladenylat zu Butyryl-CoA die Geschwindigkeit der Gesamtreaktion.

Bemerkenswerte Ergebnisse wurden auch mit dem ATP-Analogen dATP erhalten. Am auffälligsten zeigten sich dabei die Veränderungen mit den beiden Substratcarbonsäuren Propionat und Isobutyrat. Zum einen wurden weniger stabile Adenylate gebildet, so daß nunmehr auch die Rückreaktionen nachzuweisen waren. Zum anderen wurde jedoch als Folge der verringerten Adenylatakkumulation auch eine drastische Verringerung der Acyl-CoA-Synthese verzeichnet. Genau umgekehrt verhielten sich die Effekte mit Acetat und Butyrat. In diesen Fällen wurde dATP genauso gut oder sogar noch besser angenommen als das eigentliche Nukleotidsubstrat ATP. Dies betraf sowohl die Adenylierungsreaktion als auch die Acyl-CoA-Bildung.

Anders als beim AcsL-Protein wurde bei der Untersuchung des Glutaminsäure-aktivierenden Moduls Srf-M1 eine außerordentlich hohe Substratspezifität festgestellt. Neben dem Hauptsubstrat L-Glutaminsäure wurde keine andere proteinogene Aminosäure erkannt und aktiviert. Diese Fixierung auf eine einzige Substrataminosäure läßt sich auch in anderen Peptidsynthetase-Modulen beobachten, wobei insbesondere eine Häufung von Aktivierungsmodulen zu verzeichnen ist, die entweder Glutamin bzw. Asparagin oder Glutamin- bzw. Asparaginsäure in die Peptidkette einbauen, wie z.B. LicA<sub>1</sub>(Gln) und LicB<sub>2</sub>(Asp) aus der Lichenysin-Synthetase (Konz et al., 1999b) sowie TycC<sub>1</sub>(Asn) und TycC<sub>2</sub>(Gln) aus der Tyrocidin-Synthetase (Mootz and Marahiel, 1997b). Im Gegensatz dazu gehören sowohl das Valin-aktivierende Modul Srf-M4 als auch das Leucin-aktivierende Modul SrfA-C zu den Enzymen, die ein größeres, aber begrenztes Substratspektrum tolerieren. Eben diese Variabilität spiegelt sich auch in den verschiedenen Surfactin-Isoformen wider, in denen für beide Aminosäurepositionen entsprechende Substitutionen durch L-Isoleucin und L-Leucin bzw. L-Isoleucin und L-Valin nachgewiesen wurden (Baumgart et al., 1991; Peypoux et al., 1991 und 1994; Grangemard et al., 1997). Derartige Zusammenhänge beschränken sich aber nicht allein auf die Surfactin-Synthetase, wie die Bevorzugung spezieller Aminosäuresubstitutionen bei der Lipopeptidsynthese durch andere Peptidsynthetasen zeigt: Cyclosporin-Synthetase (Billich and Zocher, 1987), Tyrocidin-Synthetase (Mootz and Marahiel, 1997b) und Lichenysin-Synthetase (Konz et al., 1999b). Jedoch existieren bisher nur vage Vorstellungen über die Ursachen der unterschiedlichen Aminosäure-Spezifität. Beispielsweise könnten die A-Domänen der zweitgenannten Gruppe unfähig sein, zwischen strukturell ähnlichen Aminosäuren zu unterscheiden, allerdings bliebe dann immer noch die Frage, warum sich diese Schwäche nur auf einen Teil der Module begrenzt. Wahrscheinlicher ist, daß die Strukturanaloga bestimmte biologische Funktionen (z.B. Überlebensstrategien, Selektionsvorteile) übernehmen. Beispielsweise konnten Grangemard et al. zeigen, daß die

Surfactin-Isoformen [Ile4, Ile7] und [Ile2, Ile4, Ile7] infolge der höheren Hydrophobizität der apolaren Domäne stärkere Surfactanteigenschaften besaßen als das Hauptsurfactin selbst (Grangemard et al., 1997).

Hinsichtlich ihrer Bindungsaffinitäten unterscheiden sich die A-Domänen der Surfactin-Synthetase-Module Srf-M1 und SrfA-C<sub>SI003A</sub> kaum von denen anderer Peptidsynthetase-Module (Reichert et al., 1992; Galli et al., 1994; Stachelhaus and Marahiel, 1995b; Mootz and Marahiel, 1997b; Konz et al., 1999b). Während jedoch die Aminosäureaffinitäten der meisten Module Werte bis maximal 1 mM annehmen, liegt der  $K_m$ -Wert der A-Domäne von Srf-M1 für L-Glutaminsäure mit 2,5 mM deutlich über diesem Durchschnitt. Bereits andere Autoren berichteten über dieses Phänomen (Ullrich et al., 1991; Menkhaus et al., 1993; Schneider et al., 1998a), welches sich später auch bei den Untersuchungen der trimodularen Surfactin-Synthetase SrfA-A fortsetzte. Jedoch bleibt die Bedeutung dieser Abweichung unklar. Beispielsweise wäre denkbar, daß auf diese Weise die Biosynthese von Surfactin limitiert wird, die durch den Transfer der aktivierten  $\beta$ -Hydroxyfettsäure auf das Anfangsmodul Srf-M1 initiiert wird (Menkhaus et al., 1993; Vollenbroich et al., 1993). Die Untersuchungen der sehr ähnlichen Lichenysin-Synthetase scheinen diese Theorie zu bestätigen, auch dort hat das Glutamin-aktivierende Anfangsmodul eine deutlich schlechtere Aminosäureaffinität als die übrigen Module (Konz et al., 1999b). Im Falle des SrfA-C<sub>SI003A</sub>-Moduls konnten keine Unterschiede zu früheren Untersuchungen der nativen Synthetase SrfA-C (Galli et al., 1994) festgestellt werden, so daß eine Beeinträchtigung der Adenylierungsfunktion durch die Ser $\rightarrow$ Ala-Mutation innerhalb des T-Motivs der PCP-Domäne ausgeschlossen werden konnte.

Im Rahmen von Stabilitätsuntersuchungen des Srf-M1-Proteins wurde eine außerordentlich hohe Autoproteolysetätigkeit registriert, bei der die Proteinfragmentierung von zwei protease-sensitiven Regionen dominiert wurde. Dies waren zum einen die Verbindungsstelle zwischen der C-Domäne und der sich anschließenden A-Domäne und zum anderen die Scharnierregion zwischen den beiden Subdomänen der A-Domäne, die zu den mittels SDS-Page und MALDI nachgewiesenen Abbauprodukten von 52 bzw. 97 kDa führte. Beide Stellen gehören zu protease-sensitiven Regionen, die kürzlich auch bei der Untersuchung der kompletten Tyrocidin-Synthetase 1 gefunden wurden und neben den bereits genannten Positionen auch die Verbindungen zwischen A- und PCP-Domäne sowie zwischen PCP- und E-Domäne betrafen (Dieckmann et al., 1999). Die Autoren machten sich die Erkenntnis zunutze, daß vorzugsweise Loop-Regionen angegriffen werden, die zum Lösungsmittel gerichtet sind und eine hohe Flexibilität besitzen. Aus der Lage der vier identifizierten Linkerregionen schlußfolgerten sie auf deren maßgebliche Beteiligung an der gerichteten Verknüpfung der wachsenden Peptidkette durch die Vermittlung von Konformationsänderungen und Domänenbewegungen (Dieckmann et al., 1997 und 1999).

Mit einer Größe von 402 kDa gehört die trimodulare Surfactin-Synthetase zu den größten Proteinen, die bisher heterolog in *E. coli* exprimiert werden konnten. Zuzurechnen ist dies der Mitwirkung der coexprimierten *E. coli*-Chaperone GroES/EL, die für die korrekte Faltung des

SrfA-A-Proteins sorgen und darüber hinaus der schnellen Degradation entgegenwirken. Die Coexpression mit den *E. coli*-Chaperonen ist ein sehr junges Verfahren, das auch zur Expression anderer rekombinanter Proteine genutzt wurde (Cole, 1996; Georgiou and Valax, 1996; Duitman et al., 1999) und aufgrund seiner zahlreichen Vorzüge durchaus ein wertvolles Instrument bei der Klonierung größerer, schwer zugänglicher Proteine werden könnte.

Die heterologe Expression der Surfactin-Synthetase SrfA-A in *E. coli* führte zu einem aktiven Protein, das in der Lage war, entsprechend seiner modularen Zusammensetzung die beiden Substrataminosäuren L-Glutaminsäure und L-Leucin zu adenylieren und diese nach der *in vitro*-Phosphopantetheinylierung mit dem rekombinanten Sfp-Protein als Thioester zu binden. Obwohl das dritte Leucin-aktivierende Modul Srf-M3 über eine Epimerasefunktion verfügt, wurde auch die D-konfigurierte Aminosäure als Substrat im ATP-PP<sub>i</sub>-Austausch akzeptiert. Das war insofern überraschend, da D-Leucin nach früheren Berichten inhibierend auf die Surfactin-Biosynthese wirken sollte (Ullrich et al., 1991; Menkhaus et al., 1993). Dieser vermeintliche Widerspruch konnte aber kürzlich durch die Untersuchung der Kondensationsfunktion von Linne und Marahiel geklärt werden, wonach die Inhibierung der Lipopeptidsynthese auf der hohen Spezifität der Akzeptortasche für L-Leucin resultiert, während umgekehrt die verhältnismäßig niedrige Substratspezifität der Donortasche die Begründung für die Aktivierung des D-Isomers liefert (Linne and Marahiel, 2000). Durch die spätere Analyse der bimodularen Hybridenzyme ließ sich die D-Leucin-Aktivität eindeutig dem dritten Modul zuordnen, nur die genetische Manipulation innerhalb dieses Moduls (Srf<sub>AD</sub>-M1-2/3) führte zum Ausbleiben der D-Leucin-Aktivität. Andersherum zeigten sämtliche bimodularen Enzyme mit einem intakten Srf-M3-Modul diesbezüglich kaum Unterschiede gegenüber dem kompletten SrfA-A-Protein.

Obwohl die Konstruktion hybrider Peptidsynthetasen ein vielversprechendes Verfahren zur Herstellung neuartiger Peptidantibiotika darstellt, glückten bisher nur wenige Versuche zur Umprogrammierung der Aminosäuresequenz (Stachelhaus et al., 1995c; Schneider et al., 1998a, Mootz et al., 2000), alle anderen Ansätze scheiterten an den mangelhaften Kenntnissen über die Wechselwirkungen zwischen den funktionellen Domänen. Erklärtes Ziel dieser Arbeit war es daher, systematisch nach möglichen Fusionsstellen für das Protein-Engineering zu suchen. In Frage kamen dafür hauptsächlich hochkonservierte Sequenzmotive, da die variablen Bereiche vermutlich für die spezifische Erkennung der Substrataminosäuren verantwortlich sind und deshalb komplett erhalten werden sollten. Geeignete Alternativen wie die später identifizierten beweglichen Linkerregionen zwischen den C-, A- und T-Domänen (Dieckmann et al., 1999) waren mit Ausnahme der Scharnierregion zwischen den Adenylat-Subdomänen (Conti et al. 1996 und 1997) zum Bearbeitungszeitpunkt noch nicht bekannt. Ausgehend von den beiden Modulen Srf-M4 und Srf-M7 sowie der trimodularen Surfactin-Synthetase-Untereinheit SrfA-A wurden drei reziproke monomodulare Enzympaare bzw. vier bimodulare Hybridsynthetasen geschaffen, bei denen der modulare Bauplan C-A-T konsequent beibehalten wurde. Das Spektrum der verwendeten Fusionsstellen erstreckte sich

dabei über alle drei funktionellen Domänen C, A und T, um einen möglichst umfassenden Einblick in das spezifische Zusammenwirken der Domänen zu bekommen. Tatsächlich wurden zwischen den verschiedenen Rekombinationsstrategien gravierende Unterschiede festgestellt, die anhand der Erhaltung bzw. des Verlustes der katalytischen Funktionen (Adenylierung, Thioesterbindung und Peptidbildung) beurteilt wurden und nachfolgend ausführlich vorgestellt werden.

Aus der röntgenkristallographischen Analyse von zwei verwandten adenylatbildenden Enzymen war bekannt, daß sich die A-Domäne aus zwei verschiedenen großen Untereinheiten zusammensetzt, die durch eine flexible Scharnierregion miteinander verknüpft sind (Conti et al., 1996 und 1997). Die große N-terminale Subdomäne bildet dabei einen Spalt, der nach Bindung des Substrates deckelartig von der kleineren C-terminalen Subdomäne verschlossen wird. Vorangegangene Rekombinationsstudien zwischen dem Valin-aktivierenden Modul Srf-M4 der Surfactin-Synthetase SrfA-B und dem Phenylalanin-aktivierenden Modul der Tyrocidin-Synthetase TycA unterstrichen die essentielle Bedeutung dieser Region für die Funktionsfähigkeit der A-Domäne (Elsner et al., 1997). Nur Fusionen in Scharniernähe innerhalb des hochkonservierten GEL(C/Y)IGGxGLARGYL-Motivs ergaben aktive Hybridenzyme, während entferntere Rekombinationen zu mißgefalteten, inaktiven Proteinen führte. Allerdings zeigten eigene Untersuchungen eine noch relativ hohe Anfälligkeit des GEL(C/Y)IGGxGLARGYL-Motivs beim Protein-Engineering, von den zwei untersuchten reziproken monomodularen Hybridenzymen erkannte nur Srf<sub>AD</sub>-M7/4 seine Substrataminosäure. Wurde statt dessen die Fusionierung unmittelbar in die flexible Scharnierregion verschoben, waren sämtliche Hybride (Srf<sub>ADH</sub>-M4/7, Srf<sub>ADH</sub>-M7/4 und Srf<sub>ADH</sub>-M1/2-3) aktiv. Dies erscheint insofern logisch, da die Änderungen nur noch die bewegliche Region betrafen, die Faltung der beiden Subdomänen jedoch unberührt blieb. Wie Untersuchungen von Dieckmann et al. (1999) belegen, sind beide Domänen für die katalytische Funktion der A-Domäne unentbehrlich, denn die Entfernung der C-terminalen Subdomäne führte zu einem völlig inaktiven Protein. Darüber hinaus bestätigten die Enzymaktivitäten der hybriden Enzyme die Theorie von Marahiel und Mitarbeitern, nach der die Substratspezifität der A-Domäne von wenigen Schlüsselaminosäuren der N-terminalen Untereinheit festgelegt wird (Conti et al., 1997; Stachelhaus et al., 1999). Zu acht mehr oder weniger stark variierenden Aminosäuren kommen noch zwei invariante Reste hinzu, die für die Interaktion mit der  $\alpha$ -Aminogruppe (Asp235) und der  $\alpha$ -Carboxylgruppe (Lys517, Numerierung entsprechend der PheA-Kristallstruktur) verantwortlich sind.

Bei der Bestimmung der Thioesterbeladung von Srf<sub>ADH</sub>-M1/2-3 stellten sich die Grenzen dieser Fusionsstrategie heraus. Die PCP-Domäne T<sub>2</sub> des Leucin-aktivierenden Moduls Srf-M2 war nicht in der Lage, das Aminoacyladenylat der A-Domäne A<sub>1</sub> des Glutaminsäure-aktivierenden Moduls Srf-M1 zu erkennen und als Thioester zu binden. Ähnliche Ergebnisse bei der *in trans*-Aminoacylierung der Asparaginsäure-aktivierenden PCP-Domäne T<sub>5</sub> mit dem Adenylylat der Valin-aktivierenden A-Domäne A<sub>4</sub> (Weinreb et al., 1998) deuten darauf hin, daß

die PCP-Domänen trotz ihrer geringen Größe von durchschnittlich 80 Aminosäuren eine außerordentlich hohe Spezifität besitzen. Dabei dürften die spezifitätsbestimmenden Aminosäurepositionen sogar noch eher auf der N-terminalen Hälfte vor der 4'-Phosphopantethein-Bindungsstelle liegen, wie durch die Thioacylierung der chimären PCP-Domäne  $T_{1/2}$  in dem bimodularen Konstrukt  $Srf_{TD-M1/2-3}$  gezeigt werden konnte. Verständlicherweise wurde die Adenylierungsfunktion der Glutaminsäure-aktivierenden A-Domäne von der Rekombination innerhalb des  $D(D/N)FFxLGGHS(L/I)$ -Motivs nicht beeinflusst. Umgekehrt beweist aber die hohe Übereinstimmung der Glutaminsäureadenylierung von  $Srf_{ADH-M1/2-3}$  und  $Srf_{TD-M1/2-3}$  die volle Funktionsfähigkeit der hybriden A-Domäne  $A_{1/2}$  in  $Srf_{ADH-M1/2-3}$ .

Neben der Fusionierung innerhalb der A- und der PCP-Domänen wurde als dritte Rekombinationsmöglichkeit die Eignung der C-Domänen überprüft. Dabei reagierten prinzipiell alle untersuchten Module mit drastischen Aktivitätseinbußen auf Manipulationen in der Übergangsregion zwischen der C- und der darauffolgenden A-Domäne, die sogar bis zur völligen Inaktivität reichen konnten, wie bei der Deletion der kompletten C-Domäne in dem gekürzten Modul  $Srf-N\Delta M1$  oder bei der Konstruktion der reziproken Hybridenzyme  $Srf_{CD-M4/7}$  und  $Srf_{CD-M7/4}$  gezeigt wurde. Ebenso führte die Verknüpfung der  $C_2$ -Domäne des zweiten Leucin-aktivierenden Moduls  $Srf-M2$  mit der  $A_3$ -Domäne des dritten Leucin-aktivierenden Moduls  $Srf-M3$  im Falle des bimodularen Konstruktes  $Srf_{AD-M1-2/3}$  zu kaum noch meßbaren Adenylierungsaktivitäten in Höhe von weniger als 1 % gegenüber dem Wildtypenzym. Möglicherweise ist diese minimale Restaktivität die Begründung dafür, daß bei analogen Engineering-Experimenten von Stachelhaus et al. (1995c) und Schneider et al. (1998a) erstmals mit hochempfindlichen Detektionsmethoden neuartige Surfactinanaloga als Ergebnis unprogrammierter Peptidsynthetasen nachgewiesen werden konnten. Das gleiche könnte auch für die Umwandlung eines Elongations- in ein Initiationsmodul durch Linne und Marahiel gelten, bei denen das rekombinante Enzym  $TycB_3-ATE$  trotz der Entfernung der C-Domäne noch aktiv war (Linne and Marahiel, 2000). Allerdings wiesen auch Stachelhaus et al. (1995c) und Schneider et al. (1998a) auf eine massive Reduktion der Peptidsynthese hin. Keine Angaben wurden hingegen zu den Absolutwerten der Enzymaktivitäten gemacht. Als Ursache für den zum Teil völligen Zusammenbruch der katalytischen Funktion, über den auch von anderen Autoren berichtet wurde (Elsner et al., 1997; Weinreb et al., 1998), kommen wahrscheinlich überwiegend gestörte interdomänische Wechselwirkungen in Betracht. Es stellt sich allerdings die Frage, weshalb derartige Wechselwirkungen für Initiationsmodule entbehrlich sind. Ebenfalls nicht ganz auszuschließen sind Mißfaltungen der rekombinanten Enzyme, die sich jedoch aufgrund ihrer Nähe zu der von Dieckmann et al. identifizierten Linkerregion (Dieckmann et al., 1999) in Grenzen halten dürften.

Zu einem völlig anderen Ergebnis führte dagegen die Fusionierung innerhalb des hochkonservierten His-Motivs, in deren Folge eine hybride C-Domäne  $C_{1/2}$  entstand. Im ATP-PP<sub>i</sub>-Austausch zeigte das bimodulare Hybrid  $Srf_{CDM-M1-2/3}$  annähernd die gleichen L- und D-Leucin-Aktivitäten wie schon die vorhergehenden Konstrukte  $Srf_{ADH-M1/2-3}$  und

Srf<sub>TD</sub>-M1/2-3, so daß eine Beeinträchtigung domänenspezifischer Wechselwirkungen weitestgehend ausgeschlossen werden konnte. Darüber hinaus erlaubt die Konservierung der katalytischen Funktionen beider benachbarter Module eine Eingrenzung der interdomänischen Kontakte auf die Region C-terminal ab dem His-Motiv.

Die bimodularen Konstrukte Srf<sub>AD</sub>-M1-2/3 und Srf<sub>CDM</sub>-M1-2/3 enthielten jeweils ein unversehrtes Srf-M1-Modul, dessen Glutaminsäure-Aktivierung im ATP-PP<sub>i</sub>-Austausch und in der Thioacylierung deutlich über der Wildtypfunktion lag und um so höher war, je entfernter sich die verwendete Fusionsstelle befand. Das bedeutet, daß auch die modulare Umgebung einen deutlichen Einfluß auf die Enzymfunktionen besitzt. Beispielsweise könnten die Manipulationen in der C-Domäne des Folgemoduls leichte Domänenrotationen und damit eine leichtere Zugänglichkeit der Substrate zu den Aktivitätszentren bewirken. Im Fall des Konstruktes Srf<sub>AD</sub>-M1-2/3 scheint die Angleichung der Glutaminsäure-Aktivierung an die Enzymaktivität des separaten Moduls Srf-M1 diese Interpretation zu unterstützen.

Zur abschließenden Überprüfung der Peptidelongation wurden die beiden Rekombinationsstrategien, bei denen *in vitro* keine signifikante Beeinträchtigung der Adenylierungs- und Thioacylierungsfunktion nachgewiesen werden konnte (Fusionierung innerhalb des T- bzw. His-Motivs), *in vivo* auf die Umprogrammierung des Wildtyp-Surfactin-Produzenten *B. subtilis* ATCC 21332 angewandt. Über die Deletion des mittleren Leucin-aktivierenden Moduls der Surfactin-Synthetase SrfA-A (B.s. R13<sub>TD</sub> und R13<sub>CDM</sub>) hinaus wurden auch Substitutionsmutanten (B.s. R153<sub>TD</sub> und R153<sub>CDM</sub>) konstruiert, die anstelle des Srf-M2-Moduls das Asparaginsäure-aktivierende Modul Srf-M5 der Surfactin-Synthetase SrfA-B trugen. Obwohl mit Hilfe kombinierter PCR- und Restriktionsanalysen die Richtigkeit aller vier Klonierungen bestätigt wurde, konnte nur für R13<sub>CDM</sub> die Expression der Surfactin-Synthetase-Gene nachgewiesen werden. Die Andersartigkeit der übrigen drei Konstrukte äußerte sich bereits in ihrem Phänotyp: im Gegensatz zum Wildtyp ATCC 21332 und zur Deletionsmutante R13<sub>CDM</sub> waren diese asporogen, erkennbar an der feuchten Oberfläche der Kolonien und deren schneller Lyse. Nach Nakano ist das *srfa*-Gen neben seiner Funktion als Antibiotika-Gen auch mit der Sporulation assoziiert (Nakano et al., 1991). Es wäre also möglich, daß durch die Manipulationen innerhalb des *srfa*-Operons die Transkription eines zusätzlichen, für die Sporulation erforderlichen Gens unterbrochen wurde und die Surfactin-Synthese reprimiert wurde. Bestärkt wird diese Vermutung durch die Ergebnisse von Marahiel und Mitarbeitern, nach denen die Expression des *tycA*-Gens von den Sporulationsgenprodukten (Spo0A, Spo0B und Spo0E) abhängig ist (Marahiel et al., 1987). Angesichts der Unterschiede zwischen R13<sub>CDM</sub> und R13<sub>TD</sub> läßt sich vermuten, daß die Region zwischen dem T-Motiv des Srf-M1-T<sub>1</sub>-Moduls (Aminosäureposition 1003) und dem His-Motiv des Srf-M2-C<sub>2</sub>-Moduls (Aminosäureposition 1194) eine essentielle Bedeutung für die Sporulation besitzt. Im Fall der Substitutionsmutante R153<sub>CDM</sub> ist voraussichtlich der Einschub des Srf-M5-Moduls Ursache für die Asporogenität und die daraus resultierende Beeinträchtigung der Peptidsynthese. Allerdings könnte dies aber auch eine Funktion des



Asparaginsäure-aktivierenden Srf-M5-Moduls sein, wie die erfolgreichen Substitutionen des Srf-M2-Moduls gegen verschiedene Module der Gramicidin- und der ACV-Synthetase zeigen (Schneider et al., 1998a).

Angesichts der fehlenden Proteinexpression durch R13<sub>TD</sub> und R153<sub>TD</sub> war eine direkte Beurteilung der Abhängigkeit der Kondensationsfunktion von der Rekombination innerhalb des T-Motivs nicht möglich. Den einzigen Anhaltspunkt lieferte die dünnschicht-chromatographische Analyse der *in vitro*-Biosynthese durch das *E. coli*-Protein Srf<sub>TD</sub>-M1/2-3. Die Untersuchung zeigte, daß die chimäre T<sub>1/2</sub>-Domäne nicht in der Lage war, die aktivierte L-Glutaminsäure an die benachbarte C-Domäne weiterzureichen, was wiederum auf eine Störung des interdomänischen Zusammenspiels hindeutete. Demgegenüber ergaben sich im Parallelversuch für das hybride His-Motiv erste Hinweise auf dessen Funktionsfähigkeit. So wurden im Vergleich der *in vitro*-Biosynthesereaktionen von Srf<sub>CDM</sub>-M1-2/3 mit dem Wildtypenzym SrfA-A auffallend starke Parallelen festgestellt, allerdings fehlten für weiterführende Produktcharakterisierungen die nötigen Referenzmaterialien.

Die *in vivo*-Lipopeptidsynthese in *B. subtilis* bestätigte die Ergebnisse der *in vitro*-Untersuchungen. Sie ergab für die Deletionsmutante R13<sub>CDM</sub> ein neues Surfactinderivat, das massenspektrometrisch eindeutig als das erwartete Lipohexapeptid identifiziert werden konnte. Es ist damit das erste gekürzte Produkt einer Peptidsynthetase, das gezielt durch die Deletion einer kompletten Moduleinheit erzeugt wurde. Entsprechend seiner modularen Programmierung enthält es nur noch sechs Aminosäuren (<sup>1</sup>L-Glu→<sup>2</sup>D-Leu→<sup>3</sup>L-Val→<sup>4</sup>L-Asp→<sup>5</sup>D-Leu→<sup>6</sup>L-Leu), die mit einer β-Hydroxyfettsäure variabler Kettenlänge zu einem Lactonring verknüpft sind. Im MALDI-Massenspektrum zeigte das neue Peptid eine typische Signalclustering bei *m/z*-Werten zwischen 918 bis 976, die mit einer Differenz von 113 zum nativen Surfactin exakt dem deletierten Leucin-Rest entsprach. Dabei wurden genau die gleichen Fettsäuren mit C13- bis C16-Körpern in das Peptid inkorporiert wie beim Wildtyp-Surfactin (siehe auch Kluge et al., 1988; Peypoux et al., 1991; Leenders et al., 1999), so daß nicht von einer Beeinträchtigung der Acyltransferasefunktion durch die Manipulation der Surfactin-Synthetase SrfA-A auszugehen ist.

Jedoch lag die Effizienz der Surfactin-Produktion bei der Deletionsmutante deutlich unter der des Wildtypenzym. Schätzungen zufolge betrug die Peptidausbeute weniger als 5 % und damit weniger als 25 bis 50 mg pro Liter Medium umgerechnet auf die Wildtyp-Synthese von durchschnittlich 0,5 bis 1 g/l (siehe auch Peypoux and Michel, 1992; de Ferra et al., 1997; Schneider and Marahiel, 1998b). Derart drastische Reduktionen wurden bereits bei verschiedenen Moduls substitutionen durch Stachelhaus et al. (1995c) und Schneider et al. (1998a) beschrieben, allerdings machten die Autoren keine näheren Angaben zu den Syntheseraten. Für dieses Resultat sind vermutlich mehrere Faktoren verantwortlich, wobei der Aufhebung intermodularer Wechselwirkungen durchaus eine Schlüsselrolle zukommen könnte. Schließlich wurden die eigentlichen modularen Verknüpfungen zwischen Srf-M1, -M2 und -M3 gelöst und durch ein Zwei-Komponenten-System, bestehend aus dem

unveränderten Srf-M1 und dem nunmehrigen hybriden Folgemodul Srf<sub>CDM</sub>-M2/3, ersetzt. Infolgedessen stand dem letzten Modul anstelle des eigentlichen Substrates, einem linearen Lipodipeptid aus FS→L-Glu→L-Leu, nur noch ein FS→L-Glu-Intermediat für die Surfactin-Synthese zur Verfügung. Es ist sogar möglich, daß entgegen den Auffassungen von Belshaw et al. (1999) sowie Linne und Marahiel (2000) auch die Donortaschen der C-Domänen ein gewisses Maß an Substratspezifität besitzen, da die Inhibierung der Biosynthese im vorliegenden Fall nicht mit dem Einfluß der Akzeptorspezifität begründet werden kann. Im Vordergrund dieser Überlegungen stand dabei die Tatsache, daß die beiden Module Srf-M2 und -M3 (ungeachtet der späteren Epimerisierung durch die E-Domäne von Srf-M3) für die Erkennung und Aktivierung derselben Aminosäure L-Leucin verantwortlich sind, die Akzeptortaschen der beiden C-Domänen C<sub>2</sub> und C<sub>3</sub> zwangsläufig also auch die gleiche Substratspezifität haben müssen. Für die Akzeptortasche der aus beiden Leucin-aktivierenden Modulen zusammengesetzten C-Domäne in Srf<sub>CDM</sub>-M1-2/3 folgte daraus wiederum, daß diese gleichermaßen spezifisch für L-Leucin sein mußte und somit die Veränderungen gegenüber dem Wildtypenzym allenfalls die Donortasche betreffen konnten.

Eine nicht unwesentliche Rolle bei der Verminderung der Peptidausbeute spielt vermutlich auch die modifizierte Primärsequenz des neuen Peptids und die sich daraus ableitende Veränderung der dreidimensionalen Surfactin-Struktur. Normalerweise nehmen die Ringatome des konventionellen Surfactinmoleküls eine charakteristische Sattelkonformation ein, bei denen die polaren Seitenketten der Glutamin- und Asparaginsäure genau entgegengesetzt zu dem aliphatischen Kettenrest der  $\beta$ -Hydroxy-Fettsäure ausgerichtet sind (Bonmatin et al., 1992 und 1994). Durch die Deletion des zweiten Leucin-Moleküls dürfte diese Anordnung jedoch mit Sicherheit gestört werden und so zu dem beobachteten Produktionsrückgang geführt haben. Und nicht zuletzt ist die leicht verminderte Sporulationsfähigkeit ein Indiz für die Beeinträchtigung der regulativ wirkenden Sporulationsgene.

Interessante Aspekte ergaben sich aus der Untersuchung der hämolytischen und antibiotischen Eigenschaften. Während für das Surfactinderivat keine Hämolyseaktivität nachgewiesen werden konnte, hemmte es wesentlich effizienter das Wachstum von *Bacillus licheniformis* als das konventionelle Surfactin. Dies ist um so bemerkenswerter, da die Menge des synthetisierten Lipopeptids so gering war. Es ist vorstellbar, daß dieses Derivat vor allem im Hinblick auf die geringere Erythrocytentoxizität durchaus eine gute Ergänzung oder sogar eine Alternative für das ursprüngliche Surfactin werden könnte. Darüber hinaus stellten auch Stachelhaus et al. (1995c) und Schneider et al. (1998a) bei den von ihnen umprogrammierten Surfactin-Synthetasen SrfA-C (Minimalmodul-Substitution gegen fünf unterschiedliche Aminosäure-Aktivierungsmodule; Stachelhaus et al., 1995c) bzw. SrfA-A (Minimalmodul-Substitution von Srf-M2 gegen sieben Aminosäure-Aktivierungsmodule; Schneider et al., 1998a) eine Verringerung oder Einstellung der Hämolyseaktivität fest, allerdings ohne Angaben auf konkrete Versuchsbedingungen.

Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß von den untersuchten Fusionsstellen die Rekombination innerhalb des konservierten His-Motivs die günstigsten Voraussetzungen für das Protein-Engineering mitbringt. Nur diese Fusionsstrategie gewährleistete die Erhaltung der ursprünglichen funktionellen Einheit zwischen den C-, A- und T-Domänen eines Moduls. Obwohl auch bei den anderen Fusionen die modulare C-A-T-Organisation als solche beibehalten wurde, führte die Neuverknüpfung zwischen Domänen verschiedener Herkunft zur Aufhebung interdomänischer Wechselwirkungen, in deren Folge die Intermediate von der jeweils darauffolgenden Domäne nicht mehr erkannt wurden. In einer kürzlich erschienenen Veröffentlichung wurde die Konstruktion hybrider Tyrocidin-Synthetasen vorgestellt, die auf eben diesem Einheitsprinzip beruht (Mootz et al., 2000). Die Erweiterung eines bimodularen in ein trimodulares System führte zu aktiven Hybridenzymen, bei denen sämtliche katalytischen Funktionen nachgewiesen werden konnten. Im Unterschied zur eigenen Untersuchung wurde die Fusionierung aber innerhalb der kurz zuvor identifizierten, wenig konservierten Linkerregion zwischen der T- und der C-Domäne (Dieckmann et al., 1999) vorgenommen. Auch wenn die Fusionsstellen nicht identisch waren, zeigt dennoch die große Übereinstimmung der Untersuchungsergebnisse zwischen beiden Studien das enorme Potential dieser Region für künftige Engineering-Experimente. Allerdings beweisen die asporogenen, Synthetase-negativen *B. subtilis*-Stämme R153<sub>CDM</sub>, R13<sub>TD</sub> und R153<sub>TD</sub> die Notwendigkeit, ebenso die Regulationsfaktoren der Lipopeptidsynthese zu klären.