

5 Ergebnisse

5.1 Enzymatische Charakterisierung der Acetyl-CoA-Synthetase von *Lysobacter sp.* ATCC 53042

Die Acetyl-CoA-Synthetase gehört zur Familie der adenylatbildenden Enzyme, die im Gegensatz zu den A-Domänen der NRPS autonome Enzyme mit nur einer Funktion darstellen: die Aktivierung von Acetat zu Acetyl-CoA. Aufgrund ihrer engen Verwandtschaft und der Art der katalysierten Reaktion repräsentiert die Acetyl-CoA-Synthetase ein besonders einfaches Modellenzym für die funktionelle Untersuchung der Peptidsynthetasen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Acetyl-CoA-Synthetase aus *Lysobacter sp.* ATCC 53042 ausgewählt. Insbesondere sollten die beiden Reaktionsstufen während der Acyl-CoA-Synthese mit verschiedenen Carbonsäuresubstraten untersucht werden. Dazu zählten sowohl die Hin- und Rückreaktion der Adenylierung durch die Spaltung von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ bzw. durch den ATP-PP_i-Austausch (Ullrich et al., 1991) als auch die Bildung der Acyl-CoA-Konjugate mit dem Hydroxamattest (Berg, 1962).

5.1.1 Heterologe Expression des *acsL*-Gens in *E. coli* und Aufreinigung des AcsL-Proteins

Das *acsL*-Gen (Acetyl-CoA-Synthetase aus *Lysobacter*) wurde mit Hilfe einer gegen das hochkonservierte ATP-bindende Motiv YTS $\overline{\text{GTTG}}$ xPKG gerichteten Oligonukleotidsonde aus einer genomischen Cosmid-Bibliothek des *Lysobacter*-Stammes ATCC 53042 isoliert (Frank Bernhard, persönliche Mitteilung). Es kodiert für ein Protein aus 631 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 69,2 kDa. Bei einem Sequenz-Alignment des AcsL-Proteins mit den Acetyl-CoA-Synthetasen von *Alcaligenes eutrophus* (Priefert and Steinbüchel, 1992), *Bacillus subtilis* (Grundy et al., 1993), *Escherichia coli* (Blattner et al., 1993) und *Methanothrix soehngenii* (Eggen et al., 1991) wurden neben dem zur Isolierung des *acsL*-Gens benutzten Motiv fünf weitere konservierte Bereiche identifiziert (Anhang 1, Motive I bis VI). Zwischen diesen bakteriellen Enzymen wurde eine Identität von 21 % festgestellt.

Zur heterologen Expression des *acsL*-Gens wurde das 1,8 kb Genfragment mittels PCR amplifiziert, mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Hind*III geschnitten und in die Expressionsvektoren pQE-30 und pMALTM-c2 ligiert. Als Template für die PCR diente dabei das Plasmid pACL113, als Primer wurden die Oligonukleotide AcsL_f und AcsL_r verwendet. Die PCR wurde mit der Vent[®]-DNA-Polymerase durchgeführt, die optimale Annealing-Temperatur lag bei 52 °C. Die resultierenden Plasmide pH-*acsL* und pM-*acsL* wurden anschließend in den *E. coli*-Stamm XL1-Blue transformiert und auf Proteinexpression getestet. Sowohl die Fusion mit einem N-terminalen Poly(His)₆-tag als auch mit dem N-terminalen 42 kDa-Maltose-Bindungs-Protein (MBP) ergaben ein lösliches AcsL-Protein, das nach der

Induktion mit IPTG überexprimiert wurde. Die Proteine wurden im folgenden als H-AcsL für das Poly(His)₆-getaggte Enzym (70 kDa) bzw. als M-AcsL für die MBP-Fusionierung (111,2 kDa) bezeichnet.

Zur Isolierung der AcsL-Proteine wurden die IPTG-induzierten Zellen pelletiert, in Aufschlußpuffer 1 resuspendiert und mit der French[®] Press aufgeschlossen. Die Aufreinigung der Enzyme aus dem Rohextrakt erfolgte für das M-AcsL-Protein in einer Stufe mittels Affinitätschromatographie an Dextrin und im Fall des H-AcsL über zwei Reinigungsstufen mittels Perfusionschromatographie an einer BioCADTM-Workstation. Dazu wurde der ultrazentrifugierte Rohextrakt sterilfiltriert (0,22 µm) und auf eine mit Kupfer beladene Metallchelatsäule (POROS 20 MC Cu) aufgetragen. Die Elution des Poly(His)₆-Fusionsproteins erfolgte in einer Stufe mit 100 mM Imidazol. Anschließend wurde das Eluat einer weiteren Reinigung an einer Anionenaustauschersäule (POROS 20 HQ) unterzogen, bei der H-AcsL mit 200 mM NaCl eluiert wurde. Die Expression und Aufreinigung beider AcsL-Fusionsproteine ist in Abbildung 5.1 dokumentiert. Im Fall des M-AcsL war der Reinheitsgrad, der mit der Dextrinsäule erzielt wurde, für die enzymatischen Untersuchungen völlig ausreichend.

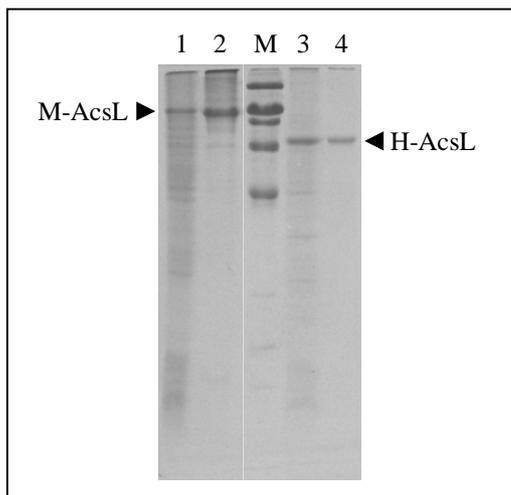


Abb. 5.1: Expression und Aufreinigung der Fusionsproteine M-AcsL und H-AcsL in *E. coli*. Es wurden jeweils 3 µg Protein auf 10 %iges SDS-Gel aufgetragen: 1, M-AcsL Rohextrakt; 2, M-AcsL nach Affinitätschromatographie an Dextrin; 3, H-AcsL Rohextrakt; 4, H-AcsL nach Affinitätschromatographie an POROS 20 MC Cu; M, High Range-Proteinmarker (von oben nach unten: 200, 116, 97, 66, 45 kDa).

5. 1. 2 Bestimmung der spezifischen Aktivität des AcsL-Proteins und Optimierung der Reaktionsbedingungen

Die gereinigten AcsL-Proteine wurden auf ihre Fähigkeit untersucht, Acetat zu Acetyl-CoA zu aktivieren. Es wurde festgestellt, daß die gemessenen Enzymaktivitäten für H-AcsL und M-AcsL identisch waren und somit eine negative Beeinflussung der katalytischen Aktivität durch das 42 kDa große Maltose-Bindungs-Protein ausgeschlossen werden konnte. Als nachteilig erwies sich jedoch die Empfindlichkeit des H-AcsL-Proteins gegenüber wiederholten

Auftauvorgängen. Für die nachfolgenden Untersuchungen wurde daher ausschließlich das M-AcsL-Protein gewählt.

Vor der detaillierten enzymatischen Charakterisierung des AcsL-Proteins wurden mit Hilfe des Hydroxamattests die Reaktionsbedingungen für die Aktivitätsuntersuchungen optimiert. Dazu wurden jeweils 4 nmol AcsL-Protein eingesetzt. Diese Enzymmenge gewährleistete einen linearen Anstieg der Acetohydroxamatbildung über einen Zeitraum von 1 h. Das Temperaturoptimum des AcsL-Proteins wurde bei 37 °C bestimmt, und sogar bei 50 °C wurden noch etwa 20 % Enzymaktivität gemessen (Abb. 5.2a). Diese Beobachtung ist insofern interessant, da *Lysobacter* bei diesen Temperaturen nicht lebensfähig ist und ein optimales Wachstum bei Temperaturen von 28 °C erreicht. Bezüglich der pH-Abhängigkeit der Acetat-Aktivierung wurden die höchsten Enzymaktivitäten bei pH-Werten zwischen 6,0 und 7,3 gemessen, das Optimum lag bei pH 6,5 (Abb. 5.2b). Darüber hinaus wurde eine Abhängigkeit der spezifischen Aktivität von der Wahl des Puffersystems beobachtet. Die besten Ergebnisse wurden mit einem MES/HEPES-Puffer bei pH 6,5 gemessen, dagegen reduzierte sich die Aktivität auf 65 % wenn statt dessen ein bis-Tris-Propan-Puffer des gleichen pH-Wertes verwendet wurde.

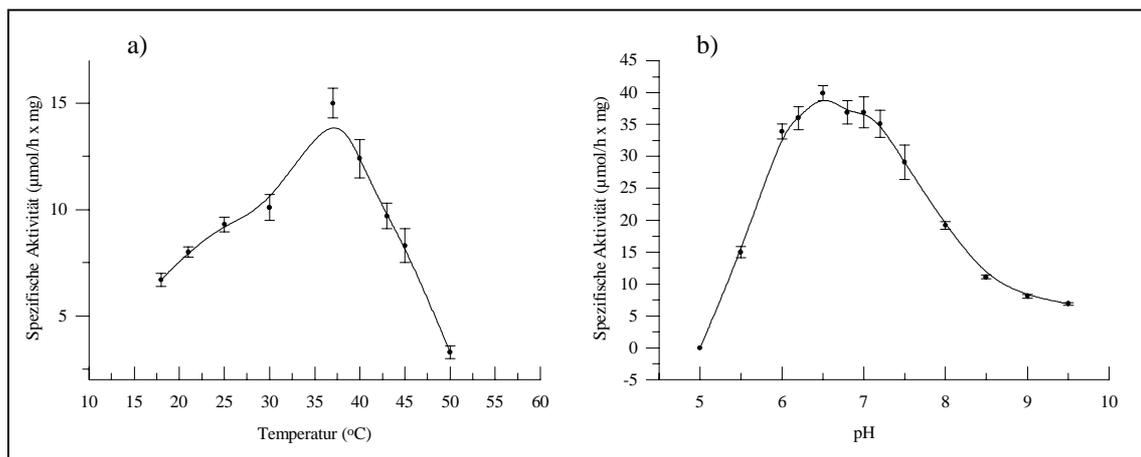


Abb. 5.2: Abhängigkeit der Acetohydroxamatbildung durch das AcsL-Protein von der Temperatur (a) und dem pH-Wert (b).

Weiterhin wurden die Bindungskonstanten der Acetohydroxamatbildung für das AcsL-Protein untersucht. Die Bestimmung führte zu folgenden Ergebnissen: für ATP lagen die K_m -Werte zwischen 0,96 und 1,41 mM (bei Acetat-Konzentrationen zwischen 2,5 und 10 mM) und für Acetat zwischen 0,98 und 2,08 mM (bei ATP-Konzentration zwischen 1 und 5 mM, Abb. 5.3). Das Auftreten als Schar paralleler Geraden sprach für einen Verlauf der Katalyse nach dem Ping-Pong-Mechanismus.

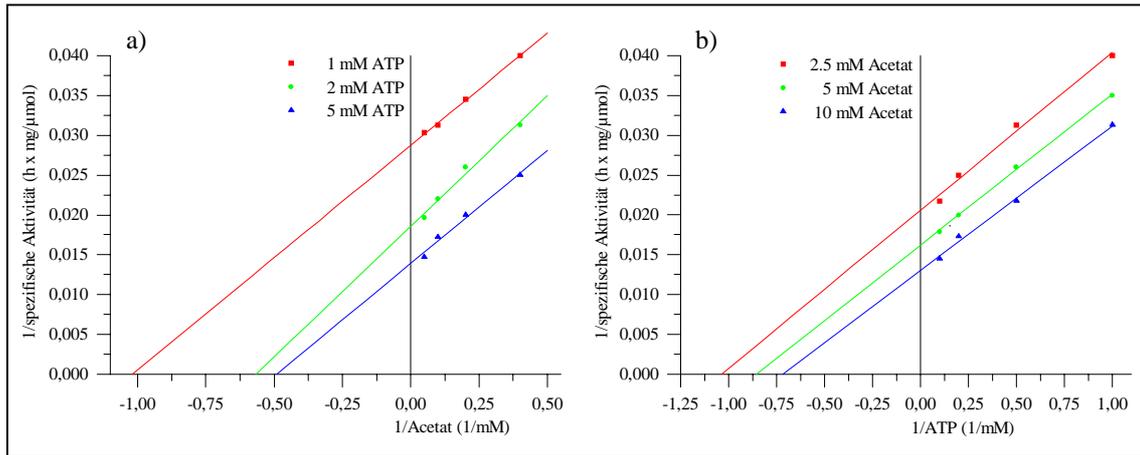


Abb. 5.3: Ermittlung der Bindungskonstanten des AcsL-Proteins für Acetat (a) und ATP (b). Die Bestimmung erfolgte mit dem Hydroxamattest, die Werte wurden aus mindestens zwei Messungen gewonnen. Aus den Schnittpunkten der Parallelen mit der reziproken Aktivitätsachse ließen sich die K_m -Werte berechnen.

5. 1. 3 Bestimmung der Carbonsäure- und Nukleotidspezifität des AcsL-Proteins

Zur funktionellen Charakterisierung der beiden Reaktionsstufen während der Substrataktivierung wurden drei verschiedene Untersuchungsmethoden verwendet: (1) die Hydrolyse von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$, (2) der ATP-PP_i-Austausch und (3) der Hydroxamattest. Die Grundlage der ersten beiden Methoden bilden die Spaltung (Hin-) bzw. die Entstehung (Rückreaktion) von radioaktiv markiertem ATP während der Adenylierungsreaktion. Dagegen beruht der Hydroxamattest auf der Synthese von Acetohydroxamat mit Hydroxylamin in Abhängigkeit von der Menge des gebildeten Acetyl-CoA-Konjugates.

Zur Untersuchung der Substratspezifität wurden sowohl Carbonsäuresubstrate steigender Kettenlänge als auch substituierte Carbonsäuren in Kombination mit ATP und dATP verwendet. Die Bestimmung der Enzymaktivitäten erfolgte entsprechend den unter *Methoden* beschriebenen Verfahren, die eingesetzten Enzymmengen betragen für die $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ -Hydrolyse und im ATP-PP_i-Austausch jeweils 50 bis 70 pmol M-AcsL und im Hydroxamattest jeweils 4 nmol M-AcsL. In Tabelle 5.1 sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen zusammengestellt.

Prinzipiell ist zu erkennen, daß das AcsL-Protein in der Lage ist, neben seinem Hauptsubstrat Acetat eine beträchtliche Anzahl weiterer Carbonsäuren zu erkennen und zu aktivieren. Das Spektrum der aktivierten Substrate reichte von C2- bis C5-Körpern und umfaßte ebenfalls modifizierte Carbonsäuren, z.B. hydroxylierte Carbonsäuren wie Milchsäure und Hydroxybuttersäure sowie einfach halogenierte Carbonsäuren wie Monochlor- und Monobromessigsäure. Darüber hinaus deutet die Begünstigung von L(+)-Lactat gegenüber D(-)-Lactat auf eine Stereoselektivität der Reaktion hin. Nicht erkannt wurden dagegen Formiat, Capronat und Benzoat. Im Falle der letzten beiden Substrate verhinderte vermutlich deren Größe die Bindung in die Substrattasche, dagegen bewies das negative Ergebnis für Formiat die Bedeutung des C α -Atoms für die Bindung des Substrates. Mehrfach halogenierte

Carbonsäurederivate, wie beispielsweise Trichloressigsäure, sowie diverse Aminosäuren wurden ebenfalls nicht akzeptiert.

Tab. 5.1: Substratspezifität des AcsL-Proteins.

Substrat	ATP-PP _i -Austausch		ATP-Hydrolyse [γ- ³² P]-ATP	Hydroxamattest	
	ATP	dATP ^a		ATP	dATP ^b
Acetat	100 (990 ± 190 cpm/min × μg)	210 ± 58	100 (1470 ± 140 cpm/min × μg)	100 (15,1 ± 2,4 μmol/h × mg)	115,3 ± 4,7
Propionat	< 0 ^c	50,6 ± 15,5	36,3 ± 11,8	72,7 ± 2,0	21,9 ± 1,2
Isobutyrat	< 0 ^c	15,6 ± 5,7	20,4 ± 13,9	9,8 ± 0,4	2,8 ± 0,2
Butyrat	43,0 ± 15,9	100,1 ± 19,6	131,5 ± 8,0	41,4 ± 1,1	103,1 ± 3,8
Valerat	20,2 ± 4,1	9,5 ± 2,2	49,9 ± 9,9	18,5 ± 0,5	14,1 ± 0,4
L(+)-Lactat	34,9 ± 8,7	20,9 ± 8,8	n.b.	46,5 ± 12,2	51,7 ± 0,1
D(-)-Lactat	9,3 ± 2,4	5,2 ± 1,5	n.b.	14,5 ± 0,4	n.b.
DL-α-HB	28,2 ± 5,4	16,5 ± 5,7	n.b.	21,8 ± 0,1	21,7 ± 0,6
DL-β-HB	n.b.	n.n.	n.b.	7,3 ± 0,3	6,8 ± 0
γ-HB	n.b.	n.n.	n.b.	14,2 ± 0,1	14,0 ± 0,3
MCA	8,4 ± 2,3	13,2 ± 2,7	n.b.	22,7 ± 0,1	n.b.
MBA	7,0 ± 1,3	7,9 ± 5,5	n.b.	29,4 ± 0,2	n.b.

Die Aktivitäten wurden als relative Werte berechnet, die Reaktion mit Acetat/ATP wurde 100 % gesetzt. In Klammern sind die dazugehörigen spezifischen Aktivitäten angegeben. Sämtliche Aktivitäten wurden im linearen Reaktionsbereich bestimmt, die Daten wurden aus mindestens drei Messungen gewonnen. DL-α-HB, DL-α-Hydroxybutyrat; DL-β-HB, DL-β-Hydroxybutyrat; γ-HB, γ-Hydroxybutyrat; MCA, Monochloracetat; MBA, Monobromacetat; n.b., nicht bestimmt; n.n. nicht nachweisbar

^a Der ATP-PP_i-Austausch wurde mit 0,5 mM dATP anstelle von 0,5 mM ATP durchgeführt.

^b Der Hydroxamattest wurden mit 5 mM dATP durchgeführt.

^c ausführliche Beschreibung siehe Text

Besonders auffällig war das abweichende Verhalten der Substrate Propionat und Isobutyrat im ATP-PP_i-Austausch mit dem Nukleotid ATP. Während im Hydroxamattest die relative spezifische Aktivität für jedes zusätzliche C-Atom um etwa ein Viertel abnahm und damit Propionat das zweitbeste Substrat für das AcsL-Protein darstellte, konnten weder für Propionat noch für Isobutyrat Enzymaktivitäten in der ATP-PP_i-Austauschreaktion detektiert werden. Selbst nach einstündiger Inkubationszeit war der gemessene Gehalt an gebildetem radioaktiven ATP niedriger als beim dazugehörigen Leerwert ohne Carbonsäuresubstrat. Darüber hinaus ergab sich eine abweichende Kinetik für diese beiden Substrate in der [γ-³²P]-ATP-Hydrolysereaktion (Abb. 5.4). Während die Umsetzung der beiden Substrate Acetat und Butyrat sehr rasch verlief, erfolgte die Spaltung von ATP mit Propionat und Isobutyrat nur allmählich. Möglicherweise beruht dieser Effekt auf der extrem hohen Stabilität der gebildeten Acyladenylate.

Durch die Analyse des ATP-PP_i-Austauschs und des Hydroxamattests in Abhängigkeit von dem ATP-Analogen dATP konnte das breite Wirkungsspektrum des AcsL-Proteins bestätigt werden (Tab. 5.1). Im Gegensatz zu ATP wurde jedoch keine Korrelation mit der Kettenlänge beobachtet. Für den ATP-PP_i-Austausch wurde für die Substrate Acetat und Butyrat eine Verdopplung der Enzymaktivitäten im Vergleich zu den dazugehörigen ATP-Werten fest-

gestellt, die Aktivitäten der übrigen Substrate verringerten sich oder blieben mehr oder weniger unverändert. Darüber hinaus wurden nunmehr auch im Falle der beiden Substrate Propionat und Isobutyrat relativ hohe Enzymaktivitäten nachgewiesen. Auch im Hydroxamat-test führte der Nukleotidaustausch zu einer Verdopplung der Enzymaktivität von dATP/Butyrat im Vergleich zu ATP/Butyrat, die Aktivität des Hauptsubstrates blieb dagegen nahezu unverändert. Anders als beim ATP-PP_i-Austausch reduzierten sich bei der Reaktion mit Propionat und Isobutyrat die Aktivitäten auf etwa ein Drittel der dazugehörigen ATP-Werte.

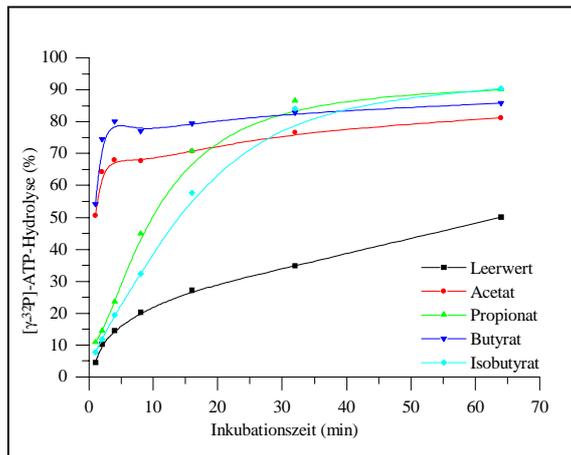


Abb. 5.4: Kinetik der ATP-Hydrolyse des AcsL-Proteins in Abhängigkeit von der Substratcarbonsäure.

Neben den Nukleotidsubstraten ATP und dATP wurden noch weitere Strukturanaloga getestet: ATP- γ -S, ADP, AMP, ITP, CTP und dGTP. Mit Ausnahme des Analogons ATP- γ -S konnte in Kombination mit dem Hauptsubstrat Acetat keine Enzymaktivität nachgewiesen werden, mit ATP- γ -S lag die ATP-PP_i-Austauschreaktion bei 62 % und im Hydroxamattest bei 69 % im Vergleich zur jeweiligen Acetat/ATP-Reaktion. Die Enzymaktivitäten mit dATP und ATP- γ -S sprechen für eine relativ hohe Toleranz bei Substitutionen an der Riboseeinheit und der Phosphatgruppe. Dagegen deutet die Ablehnung der beiden Analoga ADP und AMP auf eine Beteiligung der γ -Phosphatgruppe an der Nukleotiderkennung hin. Ferner scheint auch die Adeningruppe essentiell für die Aktivität des AcsL-Proteins zu sein, wie durch die Ablehnung anderer Basen bewiesen wurde.

5. 1. 4 Analyse der Adenylierungsreaktion mit den Substraten Propionat und Isobutyrat

Im Verlauf der Untersuchungen zur Substratspezifität des AcsL-Proteins ergaben sich Hinweise auf einen modifizierten Reaktionsmechanismus für die beiden Substrate Propionat und Isobutyrat. Es sollte daher mit Hilfe dünnschichtchromatographischer Analysen geprüft werden, ob mit diesen Substraten Acyladenylate gebildet werden können. Dazu wurde das AcsL-Protein mit den Substraten Acetat, Propionat, Butyrat und Isobutyrat in Kombination mit [α -³²P]-ATP inkubiert und das Reaktionsgemisch dünnschichtchromatographisch aufgetrennt. Die Substratmengen wurden so gewählt, daß mit Ausnahme der ATP-Konzentration

identische Reaktionsbedingungen zum Hydroxamattest vorlagen. Es wurde erwartet, daß während der Adenylierungsreaktion radioaktiv markierte Acyladenylate gebildet werden, deren R_f -Werte mit den Kettenlängen der Carbonsäuren korrelieren. Tatsächlich wurde in jedem Reaktionsansatz neben AMP ein zusätzliches substratspezifisches Produkt nachgewiesen, das vermutlich dem gesuchten Acyladenylat entsprach (Abb. 5.5a). Diese Vermutung wurde durch die dünnenschichtchromatographische Analyse der Reaktionsgemische nach CoA-Zusätzen bestätigt, bei dem die in der ersten Aktivierungsstufe gebildeten Acyladenylate vollständig zu radioaktiv markiertem AMP und den entsprechenden nicht markierten Acyl-CoA-Konjugaten umgesetzt wurden (Abb. 5.5b).

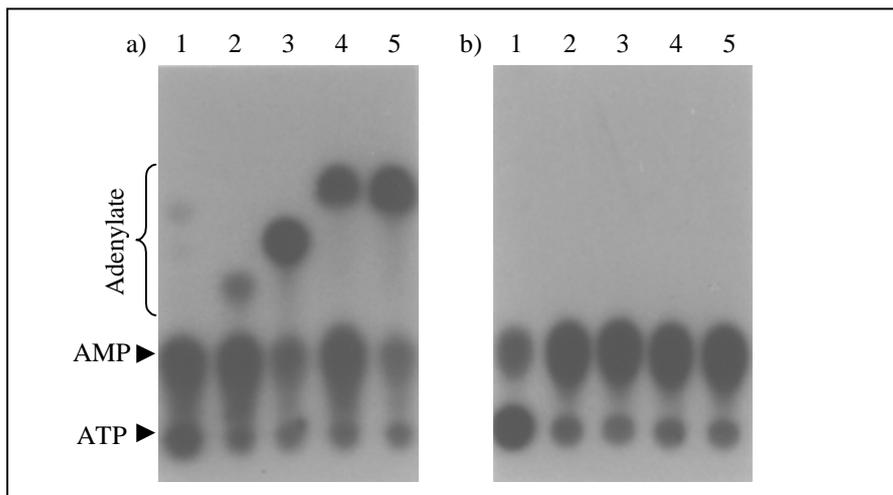


Abb. 5.5: Dünnschichtchromatographische Analyse der Acyladenylatbildung durch das AcsL-Protein in Abwesenheit (a) und Gegenwart (b) von 0,8 mM CoA. Es wurden jeweils 2 μ l des Reaktionsansatzes auf eine Kieselgelplatte aufgetragen und mit dem Fließmittel 2 chromatographiert. Die Identifizierung der radioaktiven Spots erfolgte autoradiographisch. Die Spuren enthielten: 1, Leerwert ohne Substrat-carbonsäure; 2, Acetat; 3, Propionat; 4, Butyrat; 5, Isobutyrat; R_f -Werte: [α - 32 P]-ATP (R_f 0); AMP (R_f 0,10); Acetyladenylat (R_f 0,193); Propionyladenylat (R_f 0,250); Butyrylidenylat (R_f 0,297); Isobutyrylidenylat (R_f 0,293).

Außerdem wurde festgestellt, daß sich das Verhältnis von synthetisiertem Acyladenylat zu AMP in den Reaktionen mit Propionat und Isobutyrat umgekehrt zu dem Adenylat/AMP-Verhältnis der Reaktionen mit Acetat und Butyrat verhielt (Abb. 5.5a). Während in den Reaktionen mit Propionat und Isobutyrat mehr Acyladenylat gebildet wurde, war es in den Reaktionen mit Acetat und Butyrat mehr AMP. Diese Beobachtungen liefern eine mögliche Erklärung für das abweichende Verhalten von Propionat und Isobutyrat im ATP-PP_i-Austausch. Die Lage des Gleichgewichts der Adenylierungsreaktion scheint bei diesen Substraten dermaßen auf die Seite der Reaktionsprodukte verschoben zu sein, daß die Umkehrreaktion quasi nicht meßbar ist. Dagegen korreliert die Akkumulation von AMP bei Acetat und Butyrat mit deren relativ hohen Aktivitäten im ATP-PP_i-Austausch.

5. 1. 5 Untersuchung der Adenylierungsreaktion in Abhängigkeit von der CoA- und PP_i -Konzentration

Bei der Bestimmung der Abhängigkeit der Substratadenylierung von dem zweiten Reaktanten CoA wurde festgestellt, daß die Steigerung der CoA-Konzentration infolge der Umsetzung des Acyladenylates zu einer Beschleunigung der ATP-Hydrolyse sowohl für Acetat als auch für Propionat führte (Abb. 5.6). Damit wurde der Beweis erbracht, daß mit beiden Substraten Acyl-CoA-Konjugate gebildet wurden.

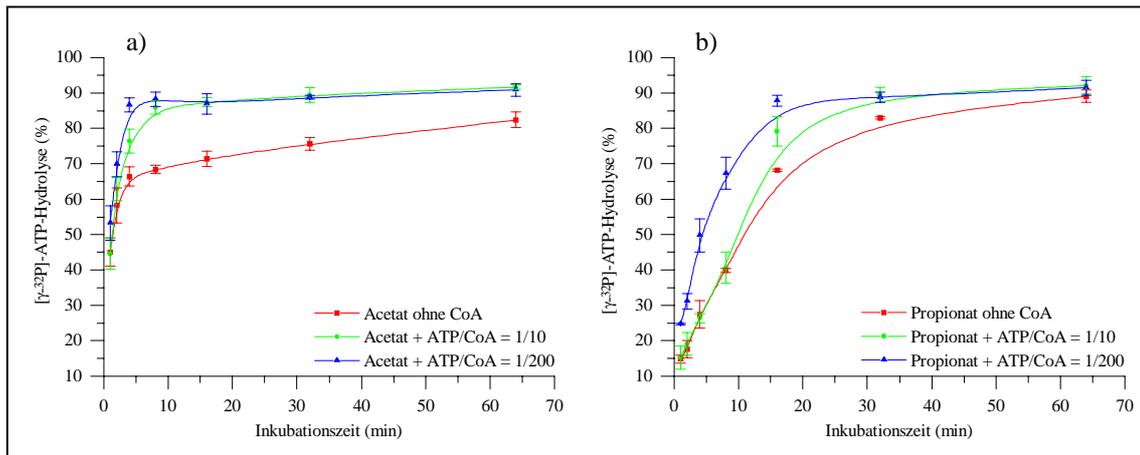


Abb. 5.6: Kinetik der ATP-Hydrolyse des AcsL-Proteins für die Substrate Acetat (a) und Propionat (b) in Abhängigkeit von der CoA-Konzentration: Die $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ -Hydrolyse wurde entsprechend der Standardvorschrift, bzw. mit zusätzlich $1,9\ \mu\text{M}$ CoA ($\text{ATP}/\text{CoA} = 1/10$) oder $38,5\ \mu\text{M}$ CoA ($\text{ATP}/\text{CoA} = 1/200$) durchgeführt.

Dieses Ergebnis wurde auch durch die Untersuchung des Einflusses der CoA-Konzentration auf die Acetohydroxamatbildung bestätigt (Abb. 5.7).

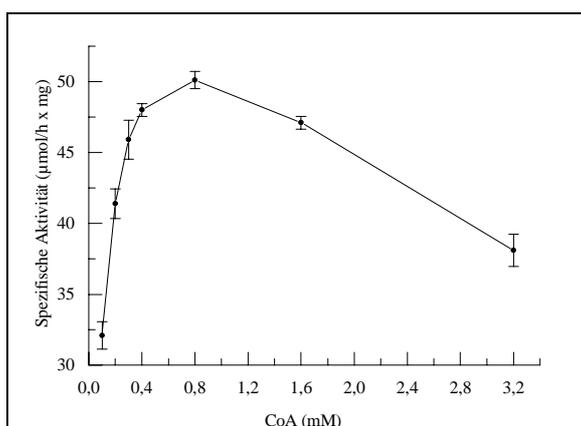


Abb. 5.7: Einfluß der CoA-Konzentration auf die Acetohydroxamatbildung.

Bis zu einer Konzentration zwischen 0,3 bis 0,8 mM CoA (entsprechend $\text{ATP}/\text{CoA} = 16/1$ bis $5/1$) stieg die Enzymaktivität steil an, bei weiterer Erhöhung der CoA-Menge wurde die

Acetohydroxamatbildung jedoch inhibiert. Vermutlich beruhte dieser Effekt auf der Konkurrenz zwischen ATP und CoA um die Enzymbindungsstelle.

Die Zugabe von PP_i während der Adenylierungsreaktion führte ebenfalls zu einer Stimulation der ATP-Spaltung (Abb. 5.8). Ähnliche Effekte wurden schon bei *Methanothrix sp.* CALS-1 beobachtet (Teh and Zinder, 1992).

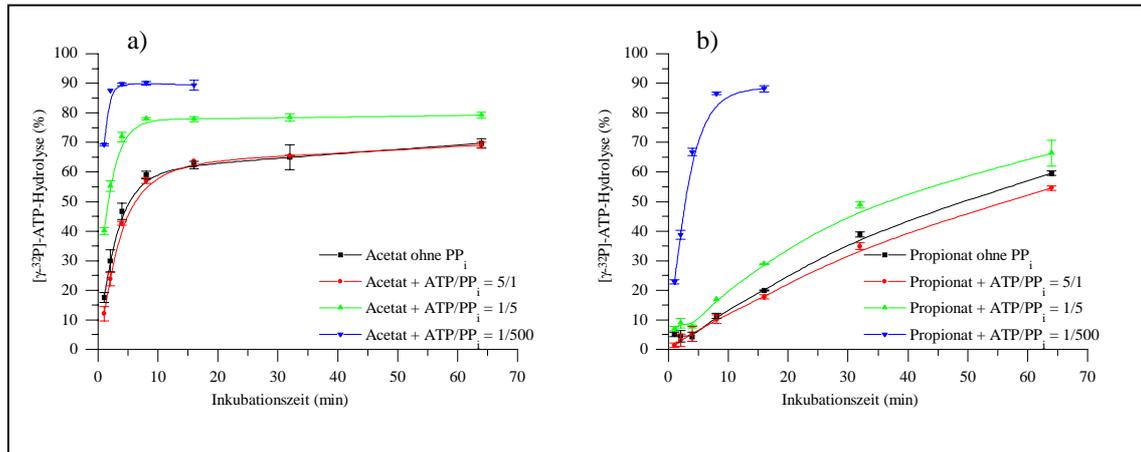


Abb. 5.8: Kinetik der ATP-Hydrolyse des AcsL-Proteins für die Substrate Acetat (a) und Propionat (b) in Abhängigkeit von der PP_i -Konzentration: Die $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ -Hydrolyse wurde entsprechend der Standardvorschrift, bzw. mit zusätzlich 38,5 nM PP_i ($\text{ATP}/PP_i = 5/1$), 962,5 nM PP_i ($\text{ATP}/PP_i = 1/5$) oder 100 μM PP_i ($\text{ATP}/PP_i = 1/519$) durchgeführt.

5.2 Enzymatische und strukturelle Charakterisierung der A-Domäne des Glutaminsäure-aktivierenden Startmoduls der Surfactin-Synthetase Srf-M1

5.2.1 Heterologe Expression und Reinigung der Glutaminsäure- und Leucin-aktivierenden Module Srf-M1 und SrfA-C_{S1003A}

Ausgehend von den Untersuchungsergebnissen der Acetyl-CoA-Synthetase wurde auch die Adenylierungsfunktion des Glutaminsäure-aktivierenden Startmoduls Srf-M1 der Surfactin-Synthetase aus *Bacillus subtilis* ATCC 21332 analysiert. Dazu wurde die kodierende Region mit Hilfe der Primer Srf-M1_f und Srf-M1_r amplifiziert, nach der Restriktion mit den Enzymen *Bam*HI und *Nco*I in den Expressionsvektor pQE-60 ligiert und anschließend in den *E. coli*-Stamm M15 [pREP4] transformiert. Zur Kontrolle der Klonierung wurde das resultierende Plasmid pH-*srf-M1* einer Restriktionsanalyse unterzogen, bei der die berechneten Fragmentgrößen mit den tatsächlich ermittelten Fragmentgrößen übereinstimmten (Abb. 5.10a). Die Restriktionsschnittstellen der Surfactin-Synthetase sind im Anhang aufgelistet (Anhang 2).

Das resultierende Protein Srf-M1 (108 kDa) bestand aus 982 Aminosäuren und umfaßte sowohl die C- als auch die A-Domäne, die T-Domäne fehlte dagegen vollständig. Parallel dazu wurden zwei verkürzte Varianten dieses Startmoduls konstruiert. Im ersten Fall wurden lediglich 16 Aminosäuren am C-Terminus entfernt, während im zweiten Fall N-terminal 460 Aminosäuren und damit die komplette C-Domäne deletiert wurden. Die Molekulargewichte

der resultierenden gekürzten Module Srf-M1 Δ C und Srf-N Δ M1 betragen 106 bzw. 57 kDa. Zur Amplifizierung der entsprechenden Genabschnitte wurden der Rückwärts-Primer Srf-M1 Δ C_r anstelle von Srf-M1_r bzw. der Vorwärts-Primer Srf-N Δ M1_f anstelle von Srf-M1_f verwendet. Abbildung 5.9 gibt eine Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte.

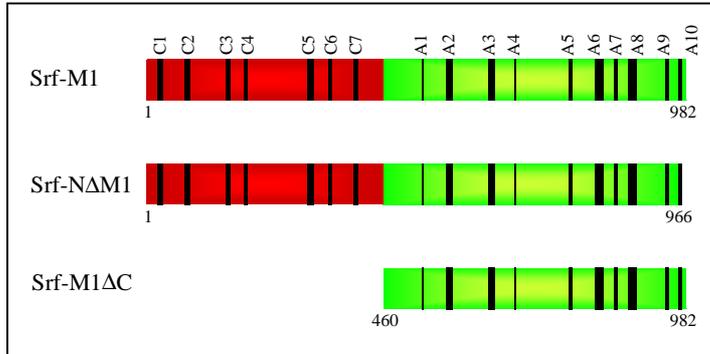


Abb. 5.9: Schematische Darstellung des Glutaminsäure-aktivierenden Moduls Srf-M1 und der gekürzten Module Srf-M1 Δ C und Srf-N Δ M1. Die unteren Zahlen entsprechen den Aminosäurepositionen in Bezug auf die Wildtyp-Numerierung, ebenfalls eingezeichnet wurden die konservierten Motive (Tab. 2.1).

Die Fermentation der plasmidhaltigen *E. coli*-Zellen erfolgte routinemäßig bei 28 °C. Nach dem Aufschluß der Bakterienpellets in Aufschlußpuffer 2 wurden die vollständig löslichen Proteine über eine bzw. zwei Reinigungsstufen mittels Gelperfusionschromatographie an einer mit Nickel beladenen Metallchelatsäule (POROS 20 MC Ni) und einer Anionenaustauschersäule (POROS 20 HQ) aufgereinigt, bei der die Proteine Srf-M1 und Srf-M1 Δ C in jeweils einer Stufe mit 150 mM Imidazol (POROS 20 MC Ni) bzw. mit 500 mM NaCl (POROS 20 HQ) eluiert wurden. Dabei erfolgte die Affinitätschromatographie mit dem salzfreien MC-Säulenpuffer 1, der die sofortige Weiterverarbeitung der Enzyme an der Anionenaustauschersäule zuließ. Im Gegensatz dazu wurde bei dem verkürzten Modul Srf-N Δ M1 auf die zweite Reinigungsstufe an der Anionenaustauschersäule verzichtet, da der erreichte Reinheitsgrad für die nachfolgende enzymatische Charakterisierung genügte. Außerdem mußte aufgrund der signifikanten Deletion um ca. 40 kDa das zur Affinitätschromatographie verwendete Puffersystem leicht modifiziert werden, die besten Reinigungsergebnisse wurden in 20 mM Tris-Puffer pH 8,0 mit 300 mM NaCl erzielt. In Abbildung 5.10b ist die Aufreinigung der Proteine Srf-M1, Srf-M1 Δ C und Srf-N Δ M1 dokumentiert.

Das Valin-aktivierende Modul Srf-M4 stand bereits zur Verfügung (mit N-terminalem Poly(His)₆-tag; Elsner et al., 1997), desweiteren wurde das siebte Modul, die L-Leucin-aktivierende Surfactin-Synthetase SrfA-C exprimiert und aufgereinigt. Im Gegensatz zu den L-Glutaminsäure-aktivierenden Konstrukten wurde SrfA-C als komplettes Modul, einschließlich seiner T-Domäne und der integrierten TE-Domäne, kloniert. Jedoch wurde der für die 4'-Phosphopantetheinbindung verantwortliche invariante Serin-Rest innerhalb des hochkonservierten T-Motivs durch Alanin ersetzt, da andernfalls durch die *E. coli*-4'-PPT-asen nur eine partielle Beladung erreicht worden wäre und somit vor dem Hintergrund weiterführender

Kristallisationsexperimente keine homogenen Enzympräparationen gewährleistet werden konnten.

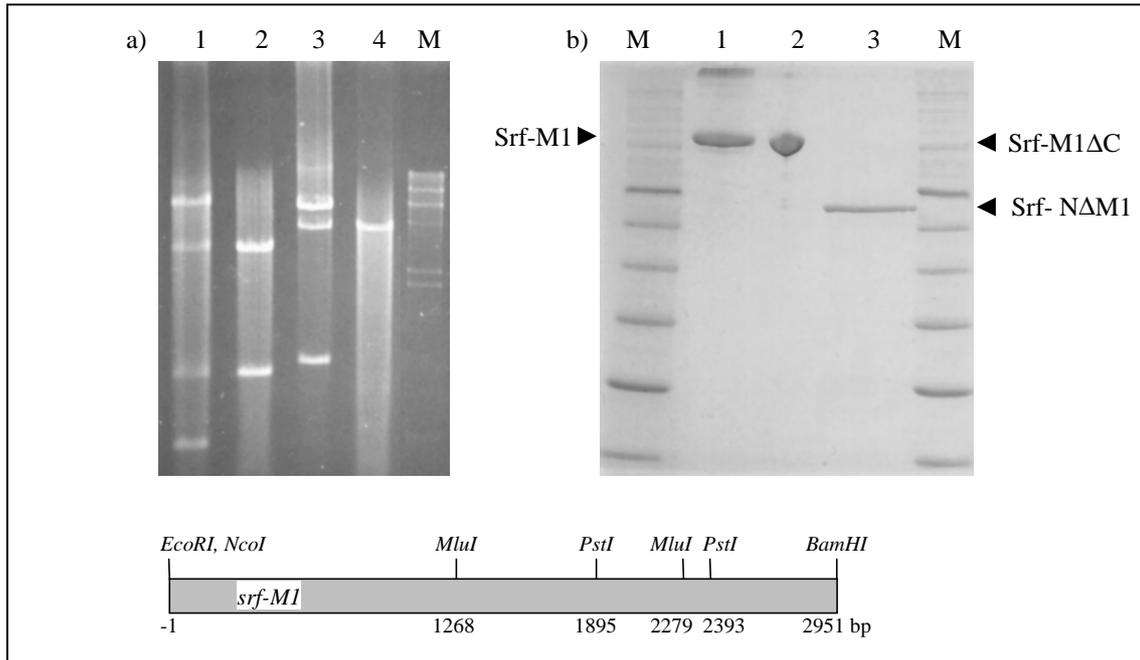


Abb. 5.10a: Restriktionsanalyse des Plasmids pH-*srf-M1*. Als Referenz diente das Repressorplasmid pREP4. Die Spuren enthielten: 1, pH-*srf-M1 PstI* (498 + 5875 bp); 2, pREP4 *PstI*; 3, pH-*srf-M1 MluI* (1011 + 5362 bp); 4, pREP4 *MluI*; M, λ -Marker *HindIII* (von oben nach unten: 23000, 9416, 6557, 4631, 2322, 2027, 564, 125 bp). Die Fragmentgrößen berechneten sich zuzüglich der pQE-60-Vektor-DNA mit 3421 bp.

Abb. 5.10b: SDS-Page der gereinigten Module Srf-M1, Srf-M1 Δ C und Srf-N Δ M1. Es wurden jeweils 3 bis 5 μ g auf ein 10 %iges Gel aufgetragen: 1, Srf-M1 nach Perfusionschromatographie an POROS 20 MC Ni und POROS 20 HQ; 2, Srf-M1 Δ C nach Perfusionschromatographie an POROS 20 MC Ni und POROS 20 HQ; 3, Srf-N Δ M1 nach Perfusionschromatographie an POROS 20 MC Ni; M, Broad Range-Proteinmarker (von oben nach unten: 212, 158, 116, 97, 66, 55, 42, 36, 26, 20 kDa).

Die Ser \rightarrow Ala-Mutagenese wurde mit Hilfe des Maxiprimers Srf-M7-Ala realisiert, zur Amplifizierung des entsprechenden Genabschnitts wurden die Oligonukleotide Srf-M7_f und Srf-M7_r verwendet. Mit Ausnahme des verwendeten Expressionsvektors wurde die Klonierung in Analogie zu Srf-M1 durchgeführt, jedoch wurde SrfA-C mit einem N-terminalen Poly(His)₆-tag (pQE-30-Vektor) fusioniert. Das resultierende Plasmid wurde mit pH-*srfA-C*_{S1003A}, das Protein mit SrfA-C_{S1003A} bezeichnet. Die Identifizierung des gewünschten Konstruktes pH-*srfA-C*_{S1003A} erfolgte durch eine Restriktionsanalyse (Abb. 5.11a).

Die Isolierung des überexprimierten Proteins Srf-M4 erfolgte entsprechend der bei Elsner et al. (1997) beschriebenen Vorschrift, für SrfA-C_{S1003A} erfolgte sie in Anlehnung an das Wildtypenzym SrfA-C (Heinz Engert, Frank Bernhard persönliche Mitteilung) über zwei Reinigungsstufen mittels Gelperfusionschromatographie an POROS 20 MC Ni sowie POROS 20 HQ. Von der Affinitätssäule eluierte das Protein mit etwa 150 mM Imidazol und von dem Anionenaustauscher mit etwa 350 mM NaCl. In Abbildung 5.11b ist die Aufreinigung des SrfA-C_{S1003A}-Proteins dokumentiert. Auffällig ist dabei das Auftreten von Abbauprodukten

(etwa 100 kDa), die sich auch durch die Behandlung mit Proteaseinhibitoren nicht vermeiden ließen (Heinz Engert, persönliche Mitteilung). Auf eine weitere Optimierung der Aufreinigungsschritte wurde trotzdem verzichtet, da sich der Reinheitsgrad für die enzymatischen Untersuchungen als ausreichend erwies.

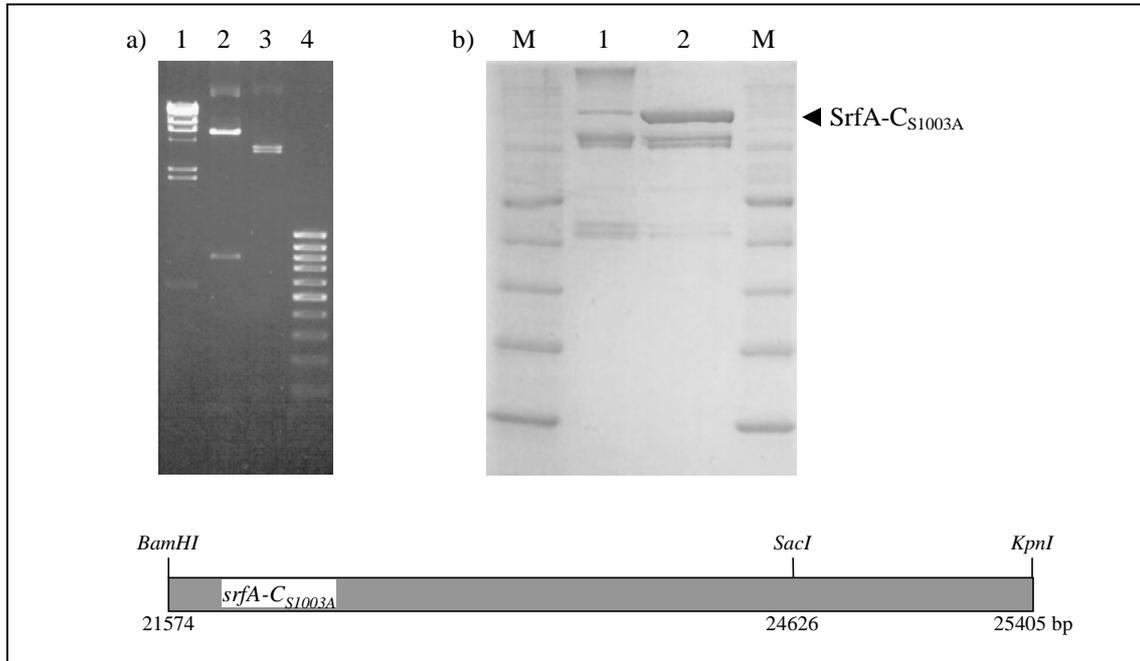


Abb. 5.11a: Restriktionsanalyse des Plasmids pH-*srfA-C_{S1003A}*. Die Spuren enthielten: 1, λ -Marker *HindIII* (von oben nach unten: 23000, 9416, 6557, 4631, 2322, 2027, 564, 125 bp); 2, pH-*srfA-C_{S1003A}* *SacI/KpnI* (779 + 6492 bp); 3, pH-*srfA-C_{S1003A}* *BamHI/KpnI* (3831 + 3440 bp); 4, MBI-100bp-Marker. Die Fragmentgrößen berechneten sich zuzüglich der pQE-30-Vektor-DNA mit 3440 bp.

Abb. 5.11b: SDS-Page des monomodularen Enzyms SrfA-C_{S1003A}. Die Spuren enthielten: 1, nach Affinitätschromatographie an POROS 20 MC Ni; 2, nach Anionenaustauschchromatographie an POROS 20 HQ; M, Broad Range-Proteinmarker (von oben nach unten: 212, 158, 116, 97, 66, 55, 42, 36, 26 kDa).

5. 2. 2 Enzymatische Charakterisierung des Glutaminsäure-aktivierenden Moduls Srf-M1

Die Charakterisierung der Adenylierungsfunktion des Srf-M1-Proteins erfolgte in Analogie zur Acetyl-CoA-Synthetase mit Hilfe des ATP-PP_i-Austauschs. Dazu wurden zunächst mit dem gereinigten Srf-M1-Protein die Inkubationsbedingungen der Austauschreaktion optimiert. Es zeigte sich, daß Srf-M1 ein relativ breites Temperaturoptimum besitzt (Abb. 5.12a). Die höchsten Werte wurden zwischen 30 und 37 °C bestimmt, jedoch reduzierten sich bei weiterer Temperaturerhöhung die Enzymaktivitäten drastisch. Bei 50 °C wurde nur noch etwa ein Viertel der Enzymaktivität gemessen. Die pH-Abhängigkeit der Glutaminsäure-adenylierung zeigte ebenfalls einen relativ breiten Toleranzbereich, zwischen pH 6,3 und 6,8 wurden die höchsten Enzymaktivitäten gemessen (Abb. 5.12b). Für die folgenden Aktivitätsbestimmungen wurden als Standardreaktionsbedingungen eine Reaktionstemperatur von 37 °C und ein pH-Wert von pH 6,5 gewählt.

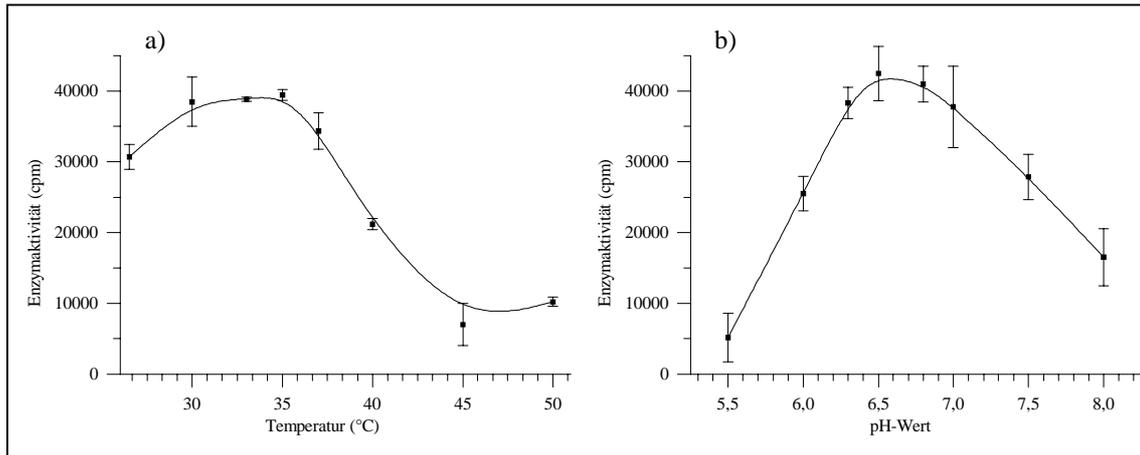


Abb. 5.12: Abhängigkeit der ATP-PP_i-Austauschreaktion des Srf-M1-Proteins von der Temperatur (a) und dem pH-Wert (b). Die Ermittlung der katalytischen Aktivität erfolgte im linearen Reaktionsbereich, die Werte wurden aus mindestens drei Einzelmessungen bestimmt. Es wurden jeweils 5 pmol des gereinigten Srf-M1 eingesetzt, die Proteinlösung wurde entsprechend vor jeder Messung mit dem Reaktionspuffer verdünnt.

Bei der Untersuchung der Substratspezifität von Srf-M1 wurde eine außerordentlich hohe Spezifität für dessen Hauptsubstrat Glutaminsäure festgestellt (Tab. 5.2), die auch mit dem ATP-Analogon dATP bestätigt werden konnte.

Tab. 5.2: Vergleich der Enzymaktivitäten verschiedener Surfactin-Synthetase-Module im ATP-PP_i-Austausch.

Enzym	Aminosäuren ^a	MW (kDa)	Spezifische Aktivität (cpm/h × pmol)	Substratspezifität (%)
Srf-M1	1 - 982	108	48000 ± 8000	Glu (100)
Srf-M1ΔC	1 - 966	106	19000 ± 3000	n.b.
Srf-NΔM1	461 - 982	57	n.n.	n.b.
Srf-M4	1 - 975	107	122000 ± 22000	Val (100), Ile (10) ^b
Srf-M4ΔC ^c	1 - 961	106	79000 ± 15000	n.b.
SrfA-C _{S1003A}	1 - 1274	140	99000 ± 26000	Leu (100), Ile (15), Val (5)

Die spezifischen Aktivitäten wurden mit den jeweiligen Hauptsubstraten Glu, Val bzw. Leu bestimmt, bei dem jeder Wert aus mindestens zwei Messungen ermittelt wurde. Zur Berechnung der prozentualen Nebenaktivitäten wurden die Aktivitäten mit den Hauptamino-säuren jeweils zu 100 % gesetzt. Alle Substratamino-säuren lagen in L-Konfiguration vor. n.b., nicht bestimmt, n.n., nicht nachweisbar

^a Aminosäurepositionen im Vergleich zum entsprechenden Wildtypenzym

^b Substratspezifitäten von Srf-M4 vgl. Elsner et al., 1997

^c freundlicherweise von Frank Bernhard (Klonierung) und Koji Tomoo (Aufreinigung) zur Verfügung gestellt

Von den getesteten 19 übrigen proteinogenen L-Aminosäuren wurde von dem Srf-M1-Protein keine andere Aminosäure als Substrat erkannt und aktiviert. Dagegen tolerierte das L-Leucin-aktivierende Enzym SrfA-C_{S1003A} neben seinem Hauptsubstrat auch noch die beiden Aminosäuren L-Isoleucin (15 % relative Aktivität) und L-Valin (5 %, Tab. 5.2). Zuvor war schon bei dem L-Valin-aktivierenden Modul Srf-M4 eine 10 %ige Nebenaktivität mit L-Isoleucin nachgewiesen worden (Tab. 5.2, Elsner et al., 1997).

Zur Beurteilung der Substrataffinitäten des Glutaminsäure-Aktivierungsmoduls wurden die Bindungskonstanten von Srf-M1 in Abhängigkeit von der L-Glutaminsäure- (L-Glu) und ATP-Konzentration bestimmt und mit den Bindungsaffinitäten des Leucin-Aktivierungsmoduls SrfA-C_{S1003A} mit den Substraten L-Leucin (L-Leu) und ATP verglichen. Die Ermittlung der K_m -Werte erfolgte mit Hilfe des Lineweaver-Burk-Diagramms, bei der die Schnittpunkte der Geraden die reziproken Werte der Bindungskonstanten K_m ergaben (Abb. 5.13).

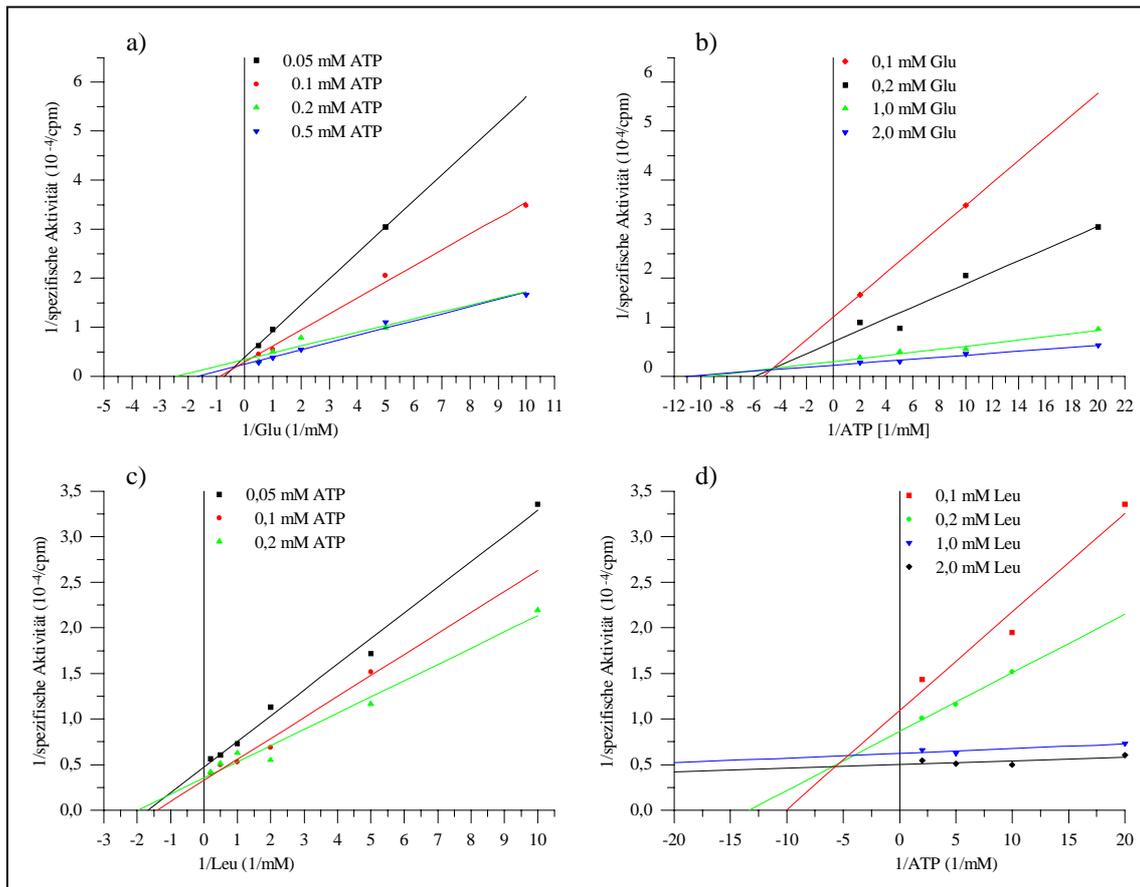


Abb. 5.13: Bestimmung der Bindungskonstanten von Srf-M1 in der ATP-PP_i-Austauschreaktion mit den Substraten L-Glutaminsäure (a) und ATP (b) sowie von SrfA-C_{S1003A} mit L-Leucin (c) und ATP (d). Die Werte wurden aus mindestens zwei Einzelmessungen gewonnen, auf die Darstellung der Standardabweichung wurde jedoch aufgrund der besseren Übersichtlichkeit verzichtet. Es wurden jeweils 5 pmol Srf-M1 (a, b) bzw. 2 pmol SrfA-C_{S1003A} (c, d) eingesetzt.

Für Srf-M1 betragen die K_m -Werte 2,5 mM für L-Glu und 0,2 mM für ATP, für SrfA-C_{S1003A} lagen die K_m -Werte bei 0,8 mM für L-Leu und bei 0,2 mM für ATP. Es fiel auf, daß beide Module zwar eine etwas höhere Affinität zu ATP als zu ihrer Substrataminosäure besaßen, die Bindungsaffinität von SrfA-C_{S1003A} zu L-Leu im Vergleich zu Srf-M1/L-Glu jedoch um den Faktor drei erhöht war.

Die bereits in der Bindungskonstante wiedergegebene geringere Aminosäureaffinität des Glutaminsäure-aktivierenden Moduls Srf-M1 gegenüber den anderen beiden Surfactin-Synthetase-Modulen spiegelte sich ebenfalls in der geringeren spezifischen Aktivität wider

(Tab. 5.2). Unter identischen Reaktionsbedingungen (37 °C, MES/HEPES-Puffer pH 6,5) zeigte Srf-M1 nur etwa die Hälfte der spezifischen Aktivität von Srf-M4 und SrfA-C_{S1003A}.

5. 2. 3 Einfluß von N- und C-terminalen Deletionen auf die spezifische Aktivität des Glutaminsäure-aktivierenden Moduls Srf-M1

Im Rahmen der strukturellen Untersuchung der Surfactin-Synthetase sollte das Srf-M1-Protein kristallisiert werden. Nach einem Sequenz-Alignment von Srf-M1 mit der PheA-Domäne der Gramicidin-Synthetase sowie der Glühwürmchen-Luciferase aus *Photinus pyralis* wurde das Enzym C-terminal um 16 Aminosäuren gekürzt (Srf-M1ΔC; Abb. 5.9), da dieser Bereich als flexible Region innerhalb der PheA-Struktur lokalisiert wurde (Conti et al., 1997; Anhang 3). Die Verkürzung ergab ein aktives Protein, wenngleich dessen spezifische Aktivität um mehr als 50 % gegenüber Srf-M1 reduziert war (Tab. 5.2). Auch durch dünnschichtchromatographische Untersuchungen konnte die Bildung des Glutamyladenylates durch Srf-M1ΔC bestätigt werden. Für das analog um 16 Aminosäuren verkleinerte Valin-aktivierende Modul Srf-M4ΔC (Elsner et al., 1997) lag die Verringerung mit 35 % gegenüber der ungekürzten Version Srf-M4 in derselben Größenordnung (Tab. 5.2).

Im N-terminal verkürzten Glutaminsäure-aktivierenden Modul Srf-NΔM1 (Abb. 5.9) führte die Entfernung der kompletten C-Domäne zu einem völlig inaktiven Protein, selbst mit 50 pmol Protein ließ sich keine Enzymaktivität mehr nachweisen (Tab. 5.2). Ähnliche Effekte waren einerseits bereits für das Valin-aktivierende Modul Srf-M4 und das Asparaginsäure-aktivierende Modul Srf-M5 beschrieben worden (Elsner et al., 1997; Weinreb et al., 1998), andererseits gelang es kürzlich Linne und Marahiel am Beispiel des Tyrocidin-Synthetase-Moduls TycB₃, ein Elongationsmodul durch Entfernung der C-Domäne in ein Initiationsmodul umzuwandeln (Linne and Marahiel, 2000). Über die Höhe der spezifischen Aktivität machten die Autoren allerdings keine Angaben.

		His	
Srf-NΔM1	139	HHVTS DGMS	··(Δ285 AS)··· DELTLISDAEKEKLLARAGGKSVSYR
Srf-NΔM4	143	HHIM DGWS	··(Δ285 AS)··· REYGLVGDEEQRQIVEVFNSTKAELP
TycB ₃ -ATE	2221	HHIA ADAAS	··(Δ285 AS)··· QEIEMLTAAEKQMLLVAFNDTHREYR
		* * . * *	* . . * . .
		A1	
Srf-NΔM1		KDMTIPELFQEKAELLSDHPAVVFEDRT	<u>LSYRTL</u> - 492
Srf-NΔM4		EGMAVHQVFEEQAKRTPASTAVVYEGTK	<u>LTYREL</u> - 496
TycB ₃ -ATE		ADQTIQQLFEELA EKMP EHTALVFEEKR	<u>MSFREL</u> -2574
		. . . * * *	* . * . * . . . * *

Abb. 5.14: Gegenüberstellung der N-Termini von Srf-NΔM1, Srf-NΔM4 (Elsner et al., 1997; dortige Bezeichnung Srf-3) und TycB₃-ATE (Linne and Marahiel, 2000). Die unterstrichenen Aminosäuren (im Ein-Buchstaben-Code) bezeichnen die deletierten Positionen. Sterne bedeuten identische Aminosäurereste, Punkte stehen für homologe Aminosäuren. Zusätzlich wurden die Distanzen zum His-Motiv der N-terminalen C-Domäne sowie zum ersten Motiv (A1) der A-Domäne dargestellt.

Darüber hinaus ergab sich bei der Überprüfung der N-Termini für das Konstrukt der Marburger Arbeitsgruppe ein Plus von 23 Aminosäuren im Vergleich zu Srf-N Δ M1 und von 27 Aminosäuren zum gekürzten Srf-M4-Protein (Abb. 5.14). Es liegt daher nahe, daß die fehlenden Aminosäuren eine essentielle Bedeutung bei der Adenylierungsreaktion besitzen und damit für die Inaktivität der gekürzten Surfactin-Synthetase-Module verantwortlich sind.

5. 2. 4 Dünnschichtchromatographische Untersuchung der Aminoacyladenylatbildung durch Srf-M1, Srf-M4 und SrfA-C_{S1003A}

Unter Anwendung der Erkenntnisse aus den Untersuchungen des AcsL-Proteins wurde auch die Adenylierungsreaktion der Surfactin-Synthetase-Module dünnschichtchromatographisch analysiert. Analog zum AcsL-Protein wurden die Module Srf-M1, Srf-M4 und SrfA-C_{S1003A} mit den jeweiligen Substrataminosäuren sowie [α -³²P]-ATP inkubiert und nach einer Phenol-extraktion dünnschichtchromatographisch analysiert. Für die Auftrennung der Reaktionsgemische wurde anstelle des Fließmittels 2 das Fließmittel 3 verwendet, da sich so die mutmaßlichen Aminoacyladenylate besser von AMP trennen ließen. Aufgrund fehlender radioaktiv markierter Referenzsubstanzen mußte die Identifizierung der Adenylate auf indirektem Wege erfolgen. Durch die alkalische Hydrolyse mit NaOH wurden die Aminoacyladenylate zu freien Aminosäuren und AMP umgesetzt (Berg, 1958). Alle drei untersuchten Surfactin-Synthetase-Module waren in der Lage ein entsprechendes Aminoacyladenylat zu bilden, jedoch unterschieden sich deren R_f-Werte kaum voneinander (Abb. 5.15).

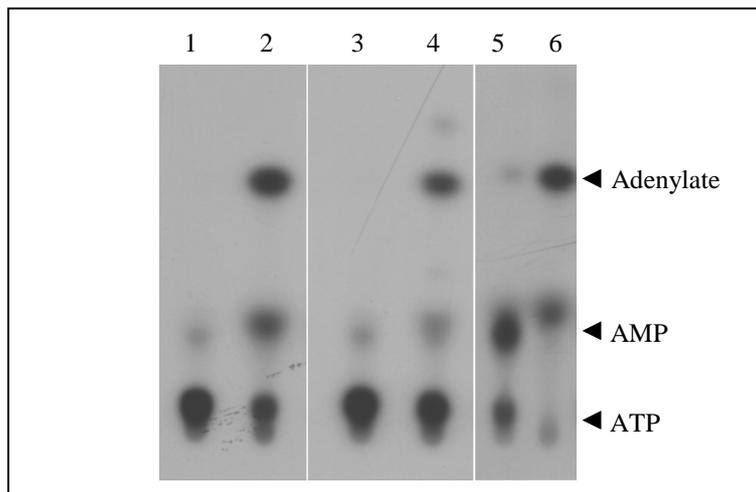


Abb. 5.15: Dünnschichtchromatographische Analyse der Bildung der Aminoacyladenylate durch Srf-M1, Srf-M4 und SrfA-C_{S1003A}. Jeweils 2 μ l der Reaktionsansätze wurden auf eine Kieselgelplatte aufgetragen und mit dem Fließmittel 3 chromatographiert: 1, Srf-M1 Kontrolle ohne Glu; 2, Srf-M1 Reaktion mit Glu; 3, Srf-M4 Kontrolle ohne Val; 4, Srf-M4 Reaktion mit Val; 5, SrfA-C_{S1003A} Kontrolle ohne Leu; 6, SrfA-C_{S1003A} Reaktion mit Leu (R_f-Werte: ATP 0,05; AMP 0,038 \pm 0,004; Glu-AMP 0,353 \pm 0,016; Val-AMP 0,381 \pm 0,013; Leu-AMP 0,387 \pm 0,010).

Die R_f-Werte lagen zwischen 0,35 (L-Glutamyladenylat) und 0,39 (L-Leucyladenylat) und zeigten damit eine gute Übereinstimmung zu den Acyladenylaten des AcsL-Proteins für das

gleiche Fließmittel (ohne Abbildung). Daneben wurde für jedes Protein die Bildung von AMP nachgewiesen, dessen Intensität deutlich geringer war als die der Aminoacyladenylate. Auch in den Kontrollreaktionen der Enzyme ohne Aminosäuren entstand in geringem Umfang AMP, der um so niedriger war, je reiner das verwendete Protein vorlag.

5. 2. 5 Strukturelle Untersuchungen des Proteins Srf-M1 mittels dynamischer Lichtstreuung, analytischer Gelfiltration und Kristallisationsexperimente

5. 2. 5. 1 Untersuchung von Srf-M1 mittels dynamischer Lichtstreuung

Für die Kristallisation eines Proteins aus einer wäßrigen Lösung ist es unbedingt erforderlich, daß dieses monodispers vorliegt. Im Vorfeld der Kristallisationsversuche des Srf-M1-Proteins wurde daher die Monodispersität der gereinigten Proteinlösungen mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS) überprüft, bei der in Abhängigkeit zur Zeit die Lichtstreuintensität gemessen wurde (Umbach, 1997). Die zu kristallisierenden Proben wurden sowohl direkt nach der Elution von der POROS 20 HQ-Säule als auch nach der Rückverdünnung aus aufkonzentrierten Proteinlösungen vermessen, um Beeinträchtigungen durch den Konzentrierungsprozeß zu erkennen (Tab. 5.3).

Tab. 5.3: Bestimmung der Partikelgröße und -verteilung mittels DLS in Abhängigkeit von der Probenvorbereitung.

[Srf-M1] (mg/ml)	kleine Partikel			große Partikel		$N_{\text{klein}}/N_{\text{groß}}$
	R_h (nm)	rel. Intensität (AU)	M_r (kDa)	R_h (nm)	rel. Intensität (AU)	
0,8 ^a	$5,4 \pm 0,6$	$3,0 \times 10^{-4}$	287	283 ± 261	$1,2 \times 10^{-3}$	5×10^9
1,6 ^a	$5,1 \pm 0,4$		242	$\gg 100$		
$6 \rightarrow 1,0$ ^b	$5,6 \pm 0,6$	$1,6 \times 10^{-4}$	320	103 ± 15	$5,4 \times 10^{-4}$	1×10^7
$10 \rightarrow 1,0$ ^b	$6,8 \pm 0,8$		574	$\gg 100$		
$100 \rightarrow 1,0$ ^b	$7,6 \pm 0,6$	$1,8 \times 10^{-4}$	801	319 ± 120	$6,0 \times 10^{-4}$	$1,5 \times 10^9$

Alle Messungen wurden mit dem ALV-Goniometer ALV / SP 86 bei konstanter Temperatur von 20 °C durchgeführt. Die relativen Molmassen (M_r) wurden anhand des Modellproteins Lysozym (R_h 2,0 nm, M_r 14,6 kDa) abgeschätzt, wobei jeweils Kugelform angenommen wurde. Die Berechnung der Partikelverteilung ($N_{\text{klein}}/N_{\text{groß}}$) erfolgte über die Partikelradien (R_h) und die relativen Intensitäten (I) nach der vereinfachten Formel ($I = R_h^6 \times N$):

$$\frac{N_{\text{klein}}}{N_{\text{groß}}} = \frac{I_{\text{klein}} \times R_{h_{\text{groß}}}^6}{I_{\text{groß}} \times R_{h_{\text{klein}}}^6}$$

^a Messung der DLS unmittelbar nach der Elution von der POROS 20 HQ-Säule

^b Messung der DLS nach Rückverdünnung aus der aufkonzentrierten Proteinlösung

Prinzipiell lagen in allen untersuchten Srf-M1-Proben zwei Partikelpopulationen vor, die kleineren Partikel mit einem Teilchenradius von mehr als 5 nm und die größeren mit weit über 100 nm. Über die Intensitäten und Teilchenradien ließ sich das Partikelverhältnis bestimmen, das in einer Größenordnung von 10^7 bis 10^9 kleinen zu großen Partikeln lag. Tendenziell wurden die geringeren Verhältniswerte vor allem in den verdünnten Protein-konzentraten beobachtet, so daß man mit steigender Konzentration von einer Aggregation der

kleineren Partikel ausgehen mußte. Wegen des enormen Proteinverbrauchs wurde jedoch auf die direkte Messung unverdünnter Proteinlösungen und damit auf die Bestätigung dieser Vermutungen verzichtet. Für die nachfolgenden Kristallisationsexperimente wurden die Proteine durchschnittlich auf etwa 10 bis 15 mg/ml aufkonzentriert, um die Aggregation der Proteine in Grenzen zu halten.

Darüber hinaus ließ sich anhand des Partikelradius‘ das Molekulargewicht der kleinen Komponenten abschätzen. Die Auswertung dieser Daten ergab erste Hinweise auf eine Verknüpfung von mindestens zwei Srf-M1-Monomeren zu größeren Untereinheiten, jedoch war mit der Methode der DLS keine eindeutige Aussage über die exakte Molekülgröße möglich. Es fiel aber auf, daß die Teilchengröße in den nicht oder nur gering aufkonzentrierten Proben relativ einheitlich bei etwa 5,4 nm lag, aus dem sich eine relative Molekülmasse von etwa 290 kDa ableiten ließ und damit eine Trimerisierung (3x108 kDa) des Srf-M1-Proteins am wahrscheinlichsten erschien.

Ferner brachte die DLS keine zusätzlichen Informationen über die Veränderungen des Srf-M1-Proteins während der Adenylierungsreaktion (Abb. 5.16). Durch die Zugabe äquimolarer Mengen an L-Glutaminsäure und ATP zu frisch eluiertem Srf-M1-Protein in An- und Abwesenheit von Magnesium wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Testsystemen gemessen.

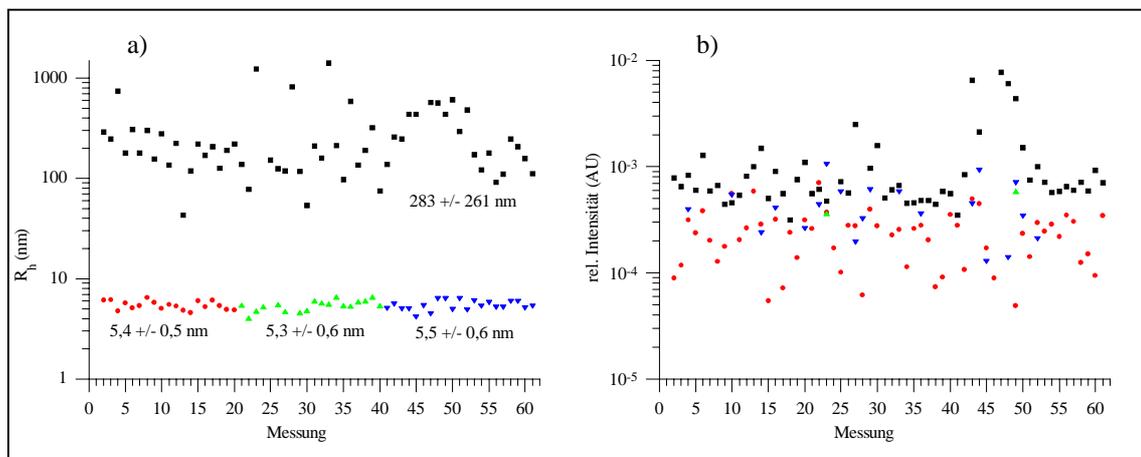


Abb. 5.16: Partikelgrößen (a) und Intensitätsverhalten (b) von Srf-M1 in Abhängigkeit von der Substratkombination. In rot/grün/blau sind die kleinen und in schwarz die großen Partikelpopulationen dargestellt: Messung-Nr. 1-20 (rot): mit L-Glu +ATP + MgCl₂; Nr. 21-40 (grün): mit L-Glu +ATP; Nr. 41-61 (blau): ohne Substrat.

5. 2. 5. 2 Untersuchung von Srf-M1 mittels analytischer Gelfiltration

Die analytische Gelfiltration an einer gepackten Sephacryl® S-400 HR-Säule sollte Aufschluß über die tatsächliche Molekülgröße des Srf-M1-Proteins geben. Nach der Kalibration der Säule mit den Proteinen Aldolase (158 kDa), Katalase (232 kDa), Ferritin (440 kDa) und Thyroglobulin (669 kDa) wurde das Elutionsvolumen (v_e) von Srf-M1 gemessen und mit Hilfe des Elutionskoeffizienten K_{av} dessen Molekulargewicht ermittelt (Abb. 5.17). Dabei

erfolgte die Berechnung des K_{av} nach folgender Gleichung, das Säulenausschlußvolumen (v_0) wurde mit Dextranblau, das Säulengesamtvolumen (v_t) mit Aceton bestimmt:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$$

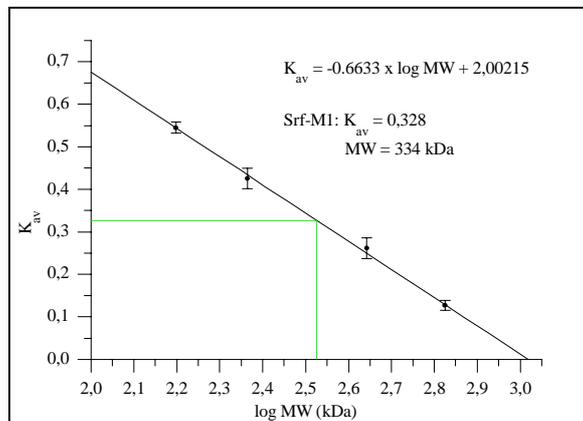


Abb. 5.17: Bestimmung des Molekulargewichts von Srf-M1 mittels analytischer Gelfiltration.

Aus dem K_{av} für Srf-M1 von 0,328 resultierte ein Molekulargewicht von 334 kDa und entsprach somit einem Trimer. Mit diesem Ergebnis bestätigten sich die Vermutungen aus den DLS-Untersuchungen, jedoch wird erst durch die Kristallstruktur des Proteins die Trimerisierung zweifelsfrei nachgewiesen werden können.

5. 2. 5. 3 Kristallisationsuntersuchungen von Srf-M1 und Srf-M1 Δ C

Für die Kristallisationsexperimente wurde das Modul mit der höchsten Enzymaktivität ausgewählt (Srf-M1) und mit den 96 Kristallisationslösungen der „Crystal screens“ CS I und CS II gescreent (Jancarik and Kim, 1991). Es zeigte sich, daß bei Proteinkonzentrationen zwischen 8 und 33 mg/ml knapp 50 % aller Kristallisationsansätze sofort oder später präzipitierten, wovon mehr als die Hälfte aus Ansätzen mit höhermolekularen Polyethylenglycolen (PEGs) stammte. Ein ebenso aussichtsreicher Kristallisationspartner schien $(NH_4)_2SO_4$ zu sein, bei einer Konzentration von 2 M wurde in fast allen untersuchten Ansätzen ein mikrokristalliner Niederschlag beobachtet. Die Suche nach geeigneten Kristallisationsbedingungen konzentrierte sich daher vorrangig auf diese beiden Familien, bei der neben der Verwendung unterschiedlicher PEGs (Kettenlänge, Modifizierung) weitere Kristallisationsparameter wie Fällungsmittelkonzentration, Puffer, pH-Wert, Additive und Temperatur systematisch variiert wurden (Tab. 5.4). Ergänzt wurden diese Kristallisationsexperimente durch die Modulation der Proteinkonzentration, -vorbereitung und -umgebung.

Tab. 5.4: Variation der Kristallisationsparameter für Srf-M1.

Präzipitant	Konzentration	0,1 M Puffer, pH-Wert	Additive
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,1; 1,5; 2; 2,1; 2,5; 3 M	-	-
	1,1; 1,5; 1,7 M	Acetat 4,6; Tris 7,8	-
	1,1 M	Citrat 5,6; Cacodylat 6,5 bzw. 7,0	-
	0,75; 1,5; 2,25 M	Tris 7,5 bzw. 7,8; HEPES 7,6	-; 15; 20; 25 % EG
	1 M	Imidazol 6,5	-; 16 % PEG MME 5 K
	1; 1,5 M	Tris 7,8	15 % EG
Li ₂ SO ₄	0,5; 1; 1,5 M	Tris 7,5 bzw. 7,8; HEPES 7,6	-; 15; 20; 25 % EG
	1,5 M	HEPES 7,6	7 % PEG 400 bzw. EG
MgSO ₄	1; 1,5 M	Tris 7,8	15 % EG
EG	57 %	HEPES 7,6	0,5 M Li ₂ SO ₄ ; (NH ₄) ₂ SO ₄ bzw. MgSO ₄
PEG MME 5 K	16 %	Imidazol 6,5	0,2 M MgSO ₄ bzw. MgCl ₂
	12,5; 25; 30 %	Tris 8,5	0,2 M Li ₂ SO ₄
	8; 16; 24 %	Citrat 5,6; Imidazol 6,5; Tris 7,8	0,2 M Li ₂ SO ₄ bzw. (NH ₄) ₂ SO ₄
PEG 4 K	7; 12,5; 17,5; 20; 25; 30 %	Tris 8,5	0,2 M Li ₂ SO ₄
	15; 30 %	Cacodylat 6,5; Tris 7,8; Bicin 9,0	0,2 M Li ₂ SO ₄
	12,5; 30 %	Cacodylat 6,5; Tris 7,8 bzw. 8,5; Bicin 9,0	0,2 M (NH ₄) ₂ SO ₄ ; MgSO ₄ bzw. LiCl
	15 %	Tris 8,5	0,1; 0,3 M Li ₂ SO ₄ bzw. 0,2 M LiCl
	30 %	Tris 8,5	0,1; 0,3; 0,6 M Li ₂ SO ₄
PEG 4 K, PEG MME 5 K	10; 15; 20; 25 %	Tris 8,5	0,2 M Li ₂ SO ₄ mit 0,1 M NaCl
PEG 6 K; PEG MME 5 K	25; 30 %	Tris 7,8 bzw. 8,5	0,2 M Li ₂ SO ₄ bzw. 0,1 M NaCl
PEG 6 K	10; 12,5; 15; 20; 25; 30 %	Tris 8,5	0,2 M Li ₂ SO ₄
PEG 6 K ^{28 °C}	15; 25; 30 %	Tris 8,5	0,2 M Li ₂ SO ₄
PEG (4; 6 K)	30 %	Tris 8,5	0,2 M Li ₂ SO ₄ mit 6,5 % Isopropanol, MPD oder EG
	15 %	Tris 8,5	0,2 M Li ₂ SO ₄ mit 10 % Isopropanol, MPD oder EG bzw. 0,1 M NaCl
PEG (1; 3; 20 K)	30 %	Tris 8,5	0,2 M Li ₂ SO ₄
PEG 8 K	12,5; 25; 30 %	Tris 8,5	0,2 M Li ₂ SO ₄

Für die Kristallisationsexperimente wurde die Dampfdiffusionsmethode im hängenden Tropfen verwendet, die Inkubation erfolgte routinemäßig bei 18 °C (mit Ausnahme von PEGs 6 K^{28 °C}: hier wurden die Ansätze zunächst für ein bzw. drei Tage bei 28 °C preinkubiert). EG, Ethylenglycol; PEG (n K), Polyethylenglycol (n x 10³); MME, Monomethylether; MPD, 2-Methyl-2,4-pentandiol

Normalerweise lag das Srf-M1-Protein nach der Elution von der Anionenaustauschersäule in einem 15 mM Tris/bis-Tris-Propan-Puffer pH 8,0 mit etwa 500 mM NaCl vor, es war daher angebracht, den recht hohen Salzgehalt durch Dialyse auf 50 mM zu reduzieren bzw. völlig zu entfernen. Ein Teil der Proteinproben enthielt darüber hinaus 5 % Glycerin (mit und ohne

1 mM DTT) oder wurde in Anlehnung an den Protein-Substrat-Komplex für das PheA-Protein der Gramicidin-Synthetase (Conti et al., 1997) mit je 2 mM ATP und Glutaminsäure sowie 4 mM MgCl₂ versetzt.

Tatsächlich führten die Kristallisationsversuche zunächst zu einem Teilerfolg, mit der Screenlösung CS I Nr. 17 (30 % PEG 4000, 0,1 M Tris pH 8,5, 0,2 M Li₂SO₄) wuchs in einer Proteinpräparation nach etwa 2 bis 3 Wochen Inkubationszeit ein Blümchenkristall (Abb. 5.18a), bei dem es sich nachweislich um einen Proteinkristall handelte. Unter identischen Bedingungen wuchsen mit dem gleichen Präparat sogar zahlreiche Minikristalle (Abb. 5.18b), die jedoch mit einer Länge von weniger als 0,1 mm für eine Röntgenstrukturanalyse zu klein waren.

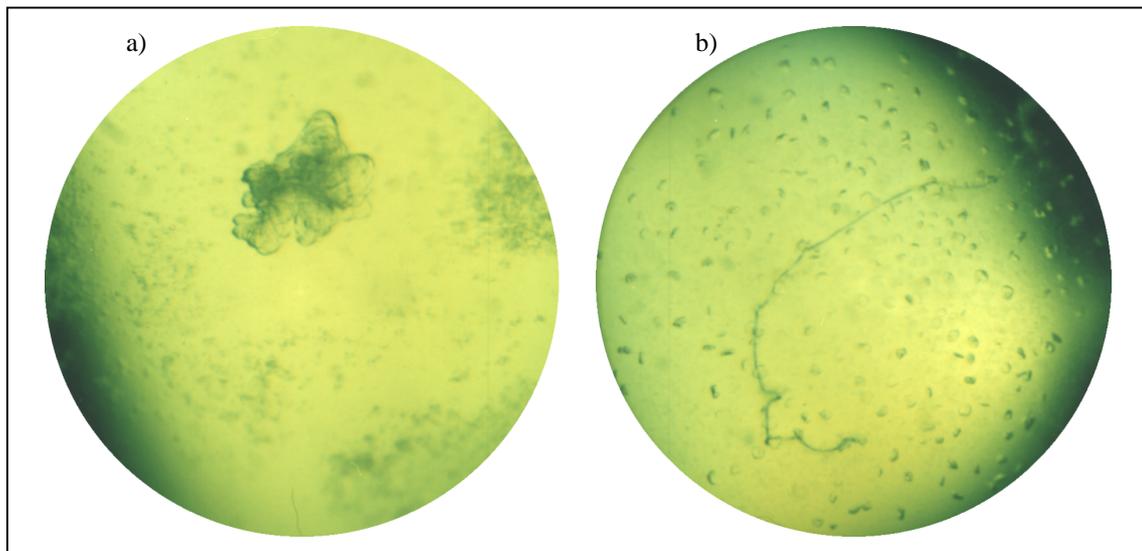


Abb. 5.18: Bildung eines Blümchenkristalles (a) und von Minikristallen (b) aus Kristallisationsansätzen einer Srf-M1-Präparation mit der Screenlösung CS I Nr. 17 (Jancarik and Kim, 1991) bei einer Temperatur von 18 °C.

Trotz intensiver Bemühungen, die neben der Verwendung von stark aufkonzentrierten Proteinlösungen mit Srf-M1-Gehalten von bis zu 100 mg/ml auch „Microseeding“-Methoden einschlossen, konnten in den weiterführenden Kristallisationsexperimenten jedoch keine weiteren Kristalle reproduziert werden, wofür vermutlich die mangelnde Stabilität des Proteins verantwortlich war. Denn bei späteren Lageruntersuchungen wurde festgestellt, daß Srf-M1 bei 4 °C bereits nach 6 bis 7 Wochen begann zu degradieren, was durch Substratzugabe sogar noch beschleunigt wurde. In allen untersuchten Proben wurden im SDS-Page zwei Abbaubanden beobachtet, die beide mit dem N-Terminus begannen und deren Molekulargewichte massenspektrometrisch zu 97 und 52 kDa bestimmt wurden (Abb. 5.19). Auch durch den Einsatz des Proteaseinhibitors PMSF konnte keine signifikante Verbesserung der Proteinstabilität festgestellt werden. Angesichts der Kristallisationstemperatur von 18 °C scheint es daher möglich, daß es sich bei den nicht reproduzierbaren Kristallen um degradierte Srf-M1-Produkte handelte.

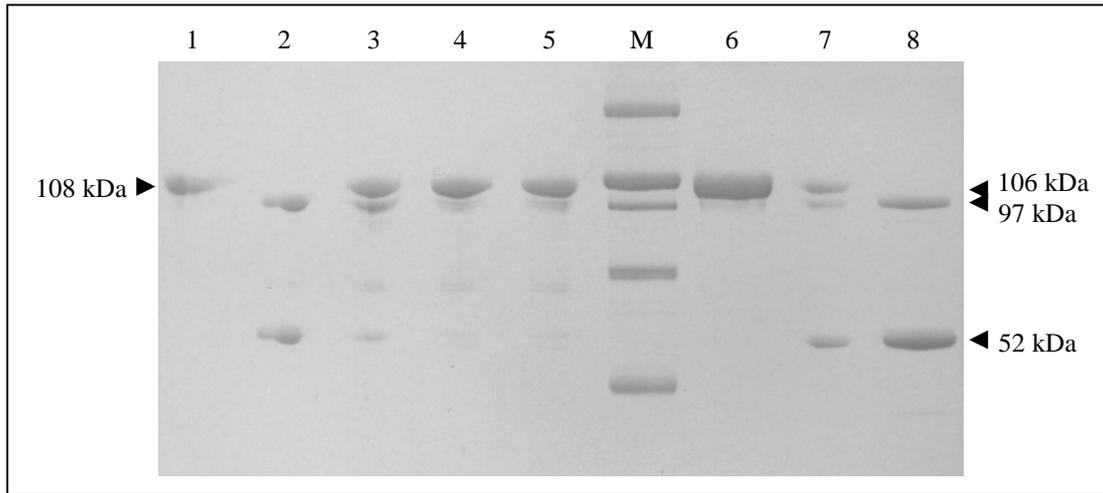


Abb. 5.19: Lagerstabilität von Srf-M1 und Srf-M1 Δ C bei 4 °C. Es wurden jeweils 10 μ g Protein auf ein 10 %iges SDS-Gel aufgetragen: 1, Srf-M1 Δ C, frisch eluiert; 2, Srf-M1 Δ C Protein-Substrat-Komplex nach 4 Wochen; 3, Srf-M1 Δ C Protein-Substrat-Komplex nach 5 d; 4, Srf-M1 Δ C nach 6 Wochen; 5, Srf-M1 Δ C nach 4 d; 6, Srf-M1, frisch eluiert; 7, Srf-M1 nach 7 Wochen; 8, Srf-M1 nach 4½ Monaten; M, High Range-Proteinmarker (von oben nach unten: 200, 116, 97, 66, 45 kDa).

Eine weitere Überlegung bestand darin, den in der PheA-Kristallstruktur nachgewiesenen flexiblen Bereich (Conti et al., 1997; Anhang 3) innerhalb des Srf-M1-Proteins zu deletieren. Mittels ATP-PP_i-Austausch und durch dünnschichtchromatographische Analysen war bereits die Funktionsfähigkeit des resultierenden Proteins Srf-M1 Δ C nachgewiesen worden, so daß dieses Protein eine geeignete Alternative zur Kristallisation von Srf-M1 darstellte. Dabei konzentrierten sich die Kristallisationsexperimente wegen der minimalen Unterschiede zu Srf-M1 vorrangig auf die systematische Analyse der PEGs, insbesondere von PEG 4000 und von (NH₄)₂SO₄ (Tab. 5.5). Darüber hinaus lag ein besonderes Augenmerk auch auf der Erprobung von PEG MME 5000, da es im Fall des verwandten PheA-Proteins zu dessen erfolgreicher Kristallisation geführt hatte (Conti et al., 1997).

Tab. 5.5: Variation der Kristallisationsparameter für Srf-M1 Δ C.

Präzipitant	Konzentration	0,1 M Puffer, pH-Wert	Additive
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,8 bis 2,8 M (Δ 0,2 M)	Cacodylat 6,5	-
	1,5 bis 3 M (Δ 0,3 M)	M/H 6,5; Tris 7,5 bzw. 8,5; Bicin 9,0	-
	0,8; 1,2; 1,6; 2 M	Acetat 4,6; Citrat 5,6; MES 6,5; Tris 7,6; 8,5 bzw. 9,0	-
	2,5; 3 M	Cacodylat 6,5; Tris 7,5	-
	2; 2,5; 3 M	Cacodylat 6,5; Tris 7,5	2 % PEG 400; PEG MME 5 K bzw. 0,2 M HD
	2; 2,5 M	Cacodylat 6,5; Tris 7,5	10 % PEG 400; PEG MME 5 K bzw. 1 M HD
(NH ₄) ₂ SO ₄	2; 2,5 M	Cacodylat 6,5	2; 4; 6; 8; 10; 12 % PEG 400 bzw. 0,1; 0,2 M MgSO ₄
NaCl	2,5; 3,5; 4; 4,5 M	Acetat 5,0; Citrat 5,6; Tris 8,5 bzw. 9,0	-

Präzipitant	Konzentration	0,1 M Puffer, pH-Wert	Additive
	2,5; 3,5; 4; 4,25 M	Acetat 5,0; Citrat 5,6; Tris 8,5 bzw. 9,0	0,2 M (NH ₄) ₂ SO ₄
EG	10; 15; 20; 25; 35; 50 %	Tris 8,5	0,2 M Li ₂ SO ₄
PEG MME 550	10; 20; 30 %	Tris 8,5	0,2 M Li ₂ SO ₄
PEG MME 5 K	15; 20; 25; 28; 30; 32 %	Cacodylat 6,5	0,2 M (NH ₄) ₂ SO ₄ bzw. MgSO ₄
	17 bis 28 % ($\Delta = 1$ %)	Cacodylat 6,5	0,2 M MgSO ₄
	28 bis 38 % ($\Delta = 2$ %)	Cacodylat 6,5	0,2 M MgSO ₄ mit / ohne 0,1 mM DTT
	24 bis 34 % ($\Delta = 2$ %)	Tris 8,5	0,2 M MgSO ₄
PEG 4 K	4; 6; 8; 10; 12; 15 %	Citrat 5,6; Cacodylat 6,5; Tris 7,6 bzw. 8,5	0,2 M Li ₂ SO ₄
	12; 15; 17,5; 20; 22; 25 %	Cacodylat 6,5 bzw. Tris 8,5	0,2 M MgSO ₄ bzw. MgCl ₂
	12 bis 35 % ($\Delta = 1$ %)	Tris 8,5	0,2 M Li ₂ SO ₄ ; (NH ₄) ₂ SO ₄ bzw. MgSO ₄
	12 bis 35 % ($\Delta = 1$ %)	Tris 7,5	0,2 M Li ₂ SO ₄ bzw. MgSO ₄
	25; 28; 30; 32; 35 %	Tris 8,5	0,2 M Li ₂ SO ₄
	8; 10; 15; 17,5 %	Cacodylat 6,5	0,2 M Li ₂ SO ₄ ; (NH ₄) ₂ SO ₄ ; MgSO ₄ bzw. 0,5 M NaCl
	12; 15; 17,5; 20; 22; 25 %	Tris 8,5	0,2 M MgSO ₄
	12; 17,5; 20; 22 %	Tris 7,0; 7,4; 7,8; 8,2; 8,5 bzw. 9,0	0,2 M MgSO ₄
PEG 4 K ⁰¹	15; 17,5; 20 %	Tris 8,5	0,2 M MgSO ₄
PEG 4 K ^{4°C}	15; 17,5; 20 %	Tris 7,0 bzw. 8,5	0,2 M MgSO ₄ , MgCl ₂ ; MgAc ₂ bzw. Li ₂ SO ₄
PEG 600; PEG (3; 4; 6; 8 K); PEG MME 2 K	10; 15; 17,5; 20; 25; 30 %	Tris 8,5	0,2 M Li ₂ SO ₄
PEG 20 K	10; 15; 20 %	Tris 8,5	0,2 M Li ₂ SO ₄
1, 6-Hexandiol	3; 3,2; 3,4 M	Cacodylat 6,5 bzw. Tris 8,5	0,1; 0,2 M MgSO ₄ bzw. MgCl ₂
	2,3; 2,5; 2,7; 2,8; 2,9; 3 M	Cacodylat 6,5; Tris 7,5 bzw. 8,5; Bicin 9,0	0,2 M MgSO ₄
	3; 3,2; 3,4; 3,6; 3,8; 4 M	Tris 8,5	0,2 M MgSO ₄ ; MgCl ₂ bzw. (NH ₄) ₂ SO ₄
	2,6 bis 3,6 M (Δ 0,2 M)	M/H 6,5; Tris 7,5 bzw. 8,5; Bicin 9,0	0,2 M MgSO ₄ ; Li ₂ SO ₄

Für die Kristallisationsexperimente wurde die Dampfdiffusionsmethode im hängenden Tropfen verwendet, wenn nicht anders vermerkt erfolgte die Inkubation bei 18 °C. Die hängenden Tropfen enthielten in jeweils gleichen Anteilen Protein- und Reservoirlösung. Die in Klammern angegebenen Konzentrationsdifferenzen beziehen sich auf die stufenweise Änderung der Fällungsmittelkonzentration. EG, Ethylenglycol; PEG (n K), Polyethylenglycol (n x 10³); MME, Monomethylether; MgAc₂, Magnesiumacetat

⁰¹, Überschichtung der Reservoirlösung mit Silikon- bzw. Paraffinöl im Verhältnis (7:2 und 7:5)

Obwohl selbst die Proteinkonzentration und -umgebung mit 12,9 bis 15,2 mg/ml Srf-M1ΔC in 15 mM Tris/bis-Tris-Propan pH 8,0 mit 50 mM NaCl eine recht starke Übereinstimmung zu den PheA-Kristallisationsbedingungen zeigte, führte keiner der zahlreichen Kristallisationsversuche zur Bildung eines für die Röntgenstrukturanalyse erforderlichen

Einkristalles. Dabei wurden sowohl Ansätze mit Srf-M1 Δ C allein als auch in Gegenwart seines Substrates (L-Glutaminsäure und MgATP) bzw. eines möglichen Inhibitors (L-Glutaminsäure und MgAMP-PNP) getestet. Ähnliche Schwierigkeiten wurden auch von der Kristallisation des Valin-aktivierenden Moduls Srf-M4 sowie des Leucin-aktivierenden Moduls SrfA-C_{S1003A} berichtet (Ingo Przylas, Koji Tomoo, persönliche Mitteilung), so daß wegen der unsicheren Erfolgsaussichten auf weitergehende Kristallisationsstudien verzichtet wurde. Darüber hinaus zeigten sich auch bei Srf-M1 Δ C Degradationserscheinungen (Abb. 5.19).

5.3 *In vitro*-Rekombination von Surfactin-Synthetase-Genen und enzymatische Charakterisierung der resultierenden Hybridenzyme

Ein anderer Lösungsansatz zur Erkennung der strukturellen und insbesondere der funktionellen Wechselwirkungen zwischen den Peptidsynthetase-Domänen zeigte sich in der *in vitro*-Rekombination der Synthetase-Gene, bei der die Surfactin-Synthetase mit ihrem regulären Aufbau ideale Voraussetzungen zur systematischen Umprogrammierung der Synthetase-Module bot.

5.3.1 Überproduktion der trimodularen Surfactin-Synthetase-Untereinheit SrfA-A durch Coexpression mit den *E. coli*-Chaperonen GroES/EL

Den Ausgangspunkt des Protein-Engineerings bildete neben den im vorhergehenden Kapitel beschriebenen Modulen Srf-M1, Srf-M4 und SrfA-C_{S1003A} (nachfolgend auch mit Srf-M7 bezeichnet) die komplette trimodulare Surfactin-Synthetase-Untereinheit SrfA-A. Zu deren heterologer Expression wurde das 10,7 kb große Genfragment unter Verwendung der beiden Oligonukleotide SrfAA_f und SrfAA_r amplifiziert und in den Expressionsvektor pQE-30 kloniert. In einer Restriktionsanalyse wurde die Richtigkeit des resultierenden Plasmids pH-*srfA-A* bestätigt, auf deren separate Darstellung jedoch an dieser Stelle verzichtet wurde, da es noch unter Kapitel 5.3.4 ausführlicher behandelt wird.

Mit einer Größe von 402 kDa ist das aus 3588 Aminosäuren bestehende Enzym SrfA-A eines der größten Proteine, die bisher heterolog in *E. coli* exprimiert werden konnten. Dabei wurde generell durch die Coexpression mit den *E. coli*-Chaperonen GroES/EL eine deutliche Steigerung der synthetisierten SrfA-A-Menge gegenüber den herkömmlichen Stämmen erreicht (Abb. 5.20). Vermutlich unterstützen die Chaperone die korrekte Faltung des für den Wirtsorganismus ungewöhnlich großen SrfA-A-Proteins und besitzen darüber hinaus eine Stabilisierungsfunktion. Für diese Vermutung sprach auch das Scheitern sämtlicher Reinigungsversuche zur vollständigen Abtrennung der Gro-Proteine. Mit einer Ausnahme wurde für die routinemäßige Expression der Surfactin-Synthetase SrfA-A sowie aller anderen Hybridenzyme der *E. coli*-Stamm DH5 α [pREP4-groESL] gewählt.

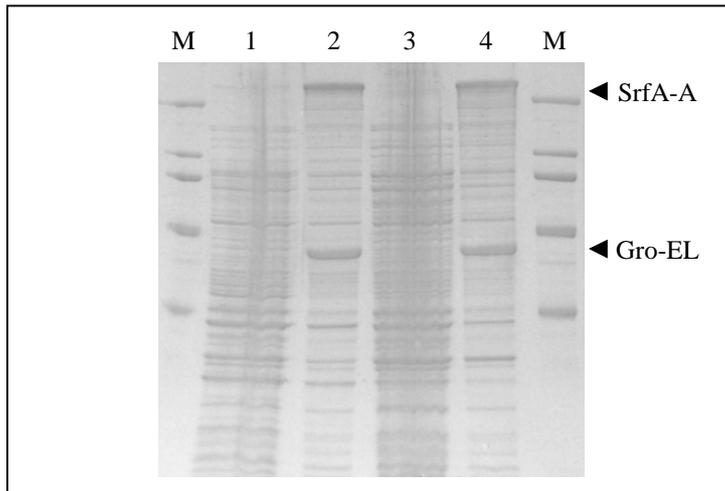


Abb. 5.20: Vergleich der Expression des 402 kDa-Proteins SrfA-A in Ab- und Anwesenheit der *E. coli*-Chaperone GroES/EL in den Stämmen DH5 α und BL21. Die IPTG-induzierten *E. coli*-Zellen wurden jeweils 4 h bei 28 °C inkubiert und auf ihre Fähigkeit zur Proteinexpression getestet. Dazu wurden jeweils 5 μ g Protein auf ein 7,5 %iges SDS-Gel aufgetragen. Die Spuren enthielten: 1 und 2, DH5 α ohne bzw. mit [pREP4-groESL]; 3 und 4, BL21 ohne bzw. mit [pREP4-groESL]; M, High Range-Proteinmarker (von oben nach unten: 200, 116, 97, 66, 45 kDa).

5. 3. 2 Strukturelle Untersuchungen der Surfactin-Synthetase-Untereinheit SrfA-A mittels Elektronenmikroskopie

Zur strukturellen Charakterisierung wurden in Kooperation mit Dr. Michael Hoppert (Universität Göttingen) elektronenmikroskopische Aufnahmen des gereinigten SrfA-A-Proteins angefertigt. Prinzipiell erfolgte die Reinigung genauso wie für die enzymatische Charakterisierung (Kapitel 5. 3. 4), anstelle des konventionellen French[®] Press-Zellaufschlusses wurden die SrfA-A-haltigen *E. coli*-Zellen jedoch mit einer 0,25 mg/ml Lysozym-Lösung aufgeschlossen. Bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung substratfreier Proben wurden größere Komplexe beobachtet, die sich auch durch stärkere Verdünnung nicht vollständig auflösten (Abb. 5.21). Die kleinste Größenklasse wurde von Partikeln mit den Ausmaßen 14,4 x 7 nm gebildet, die sich aus drei abgrenzbaren Einheiten zusammensetzten und leicht zu größeren Ketten aggregierten.

Daneben existierte noch eine kleine Fraktion ringförmiger Komplexe mit einem Außendurchmesser von 14,4 nm (Abb. 5.22), die möglicherweise das Ergebnis der Zusammenlagerung von zwei der in Abbildung 5.21 gezeigten Dreierkomplexen sein könnten. Durch die Zugabe aller an der Aminosäureaktivierung und –elongation beteiligten Substrate (L-Glutaminsäure, L-Leucin, ATP, CoA, Sfp und aktivierte Fettsäure) schien sich der Anteil der größeren Aggregate zu erhöhen.

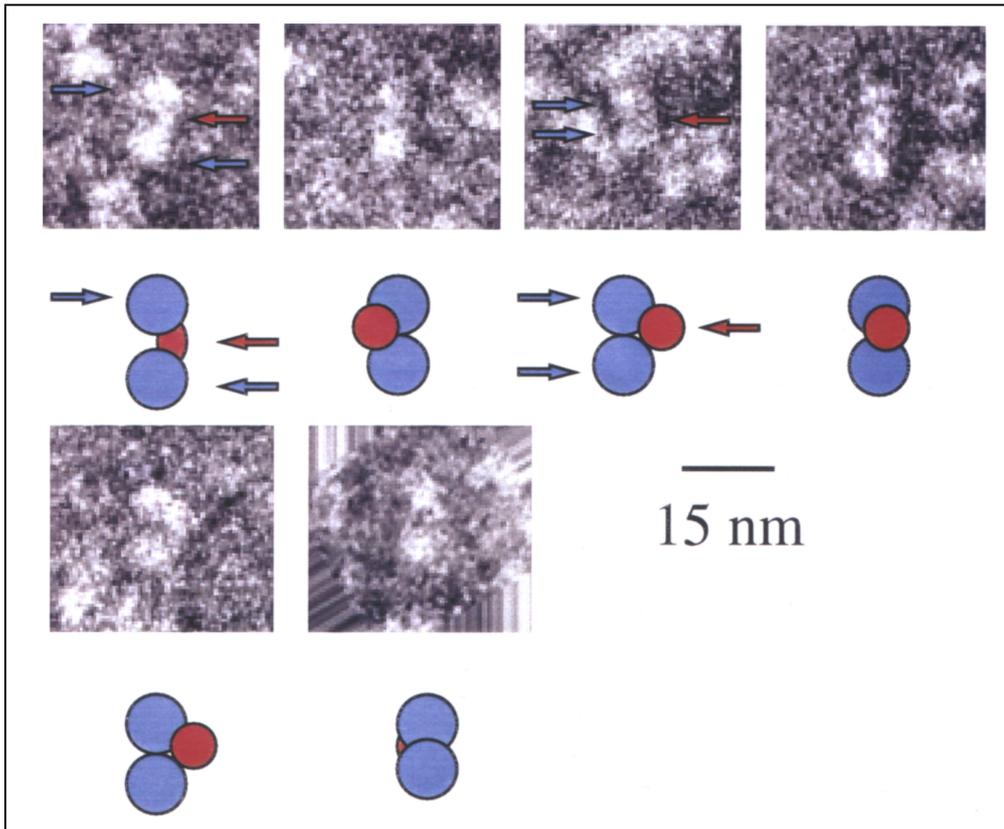


Abb. 5.21: Elektronenmikroskopische Analyse von SrfA-A. Zur Negativkontrastierung wurde Uranylacetat in hoher Schicht („deep stain“) verwendet. Die Abbildung zeigt eine Galerie der kleinsten Partikelklasse mit den aus den Projektionsformen abgeleiteten Modellen. Demnach setzen sich die Partikel wahrscheinlich aus zwei ähnlich großen Untereinheiten (in Modelldarstellung blau) zusammen, zwischen denen sich eine kleinere Einheit (rot) befindet.

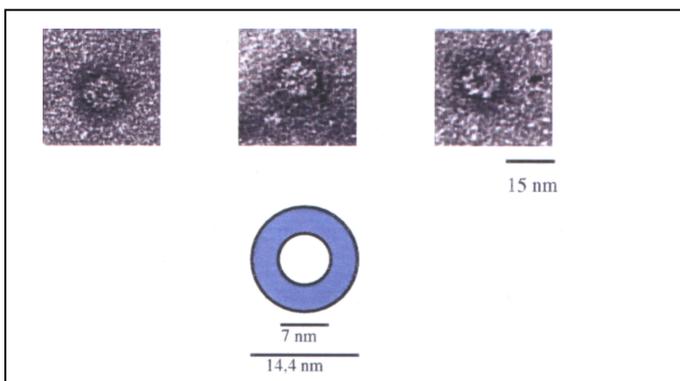


Abb. 5.22: Elektronenmikroskopische Analyse von SrfA-A. Zur Negativkontrastierung wurde Uranylacetat in dünner Schicht („flat stain“) verwendet. Die Abbildung zeigt eine Galerie ringförmiger Komplexe mit einem Modell zur Darstellung ihrer Ausmaße.

Inwiefern die beobachteten Projektionsformen zur modularen Organisation der Surfactin-Synthetase SrfA-A passen, bleibt zum gegenwärtigen Zeitpunkt nur spekulativ. Eine Dreierformation, wie sie in den elektronenmikroskopischen Untersuchungen gefunden wurde, wäre infolge des trimodularen Aufbaus durchaus naheliegend. Allerdings stehen dieser Interpretation die Größenunterschiede zwischen den drei Untereinheiten entgegen.

Theoretisch sollten die beiden aus C-, A- und T-Domäne aufgebauten Module Srf-M1 und Srf-M2 jeweils eine Größe von etwa 120 kDa besitzen und damit kleiner sein als das mit einer zusätzlich ausgestatteten E-Domäne dritte Modul Srf-M3 (160 kDa). Tatsächlich deuten die gefundenen Projektionsformen jedoch auf ein Heterotrimer hin, bei dem sich zwischen zwei ähnlich großen Untereinheiten eine kleinere Einheit befindet (Abb. 5.21).

Desweiteren wurde ein Teil der zur Elektronenmikroskopie aufgereinigten Proteincharge SrfA-A weiter aufkonzentriert (8,2 mg/ml) und zum Kristallisationscreening mit dem *Cyberlab*-Kristallisationsroboter eingesetzt. Jedoch führte keine der 48 Screenlösungen des „Crystal sceens“ CS I (Jancarik and Kim, 1991) zur Bildung eines Kristalls.

5. 3. 3 Heterologe Expression und Reinigung der 4'-Phosphopantetheinyltransferase Sfp

Die Klonierung der 4'-Phosphopantetheinyltransferase Sfp diente der späteren Charakterisierung der Thiolierungsfunktionen des SrfA-A-Proteins sowie der daraus abgeleiteten rekombinanten Hybridenzyme. Unter Verwendung der Primer sfp_f und sfp_r wurde das 690 bp große *sfp*-Gen amplifiziert und in den Vektor pMALTM-c2 ligiert. Nach der Kontrolle des resultierenden Plasmids pM-*sfp* durch eine Restriktionsanalyse (Abb. 5.23a) wurde das M-Sfp-Protein mittels Affinitätschromatographie an Dextrin aufgereinigt.

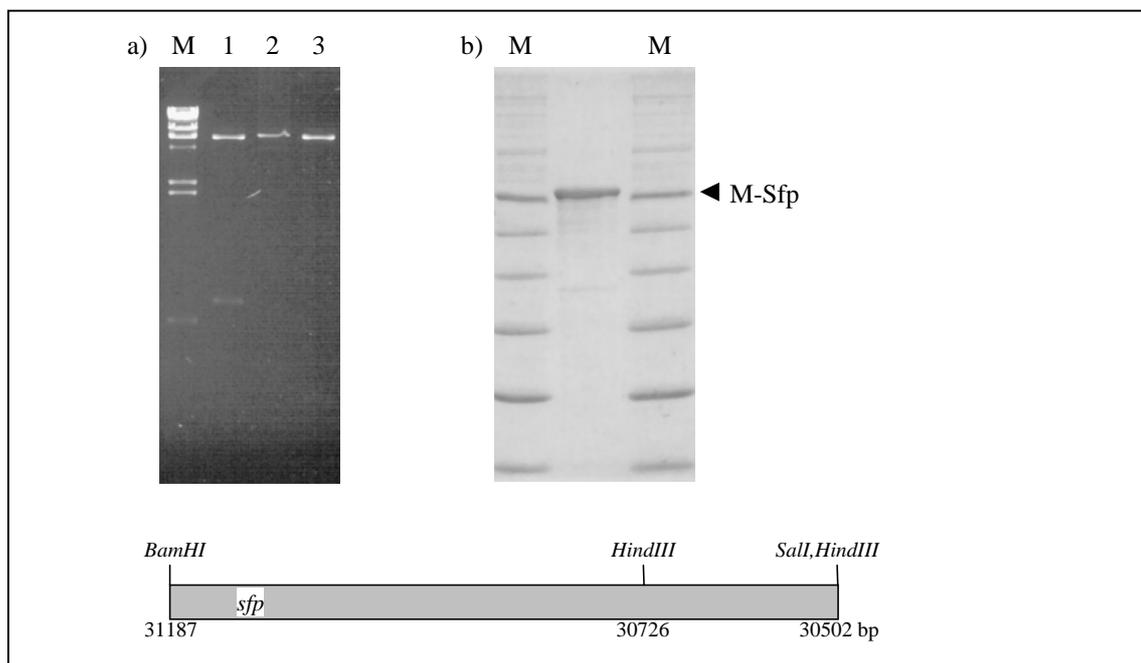


Abb. 5.23a: Restriktionsanalyse des Plasmids pM-*sfp* mit den Restriktionsenzymen: 1, *Bam*HI/*Sal*I (685 + 6709 bp); 2, *Bam*HI (7394 bp); 3, *Hind*III (224 + 7170 bp). Als Referenz diente der λ -Marker *Hind*III (M; von oben nach unten: 23000, 9416, 6557, 4631, 2322, 2027, 564, 125 bp). Die Fragmentgrößen berechneten sich zuzüglich des pMALTM-c2-Exprssionsvektors von 6709 bp. Unter dem Restriktionsverdau sind die maßgeblichen Schnittstellen des *sfp*-Inserts dokumentiert.

Abb. 5.23b: SDS-Page des gereinigten M-Sfp-Proteins. Es wurden 3 μ g des Dextrin-Eluats auf ein 10 %iges Gel aufgetragen. Als Referenz wurde der Broad Range-Proteinmarker (M) (von oben nach unten: 212, 158, 116, 97, 66, 55, 42, 36, 26, 20 kDa) benutzt.

Infolge der N-terminalen Fusionierung mit dem 42 kDa Maltose-Bindungs-Protein ergab sich für M-Sfp eine Gesamtgröße von 66,6 kDa, was mittels SDS-Page bestätigt wurde (Abb. 5.23b). Durch Parallelversuche mit einem Poly(His)₆-getaggtten Sfp-Protein (von Kollegen der AG Keller, TU Berlin, zur Verfügung gestellt) konnte nachgewiesen werden, daß die Art der Fusionierung unerheblich für die posttranslationale Phosphopantetheinylierung der PCP-Domänen war.

5. 3. 4 *In vitro*-Rekombination von Surfactin-Synthetase-Modulen

Zur systematischen Suche nach geeigneten Fusionsstellen für das Protein-Engineering wurden sowohl mono- als auch bimodulare Hybridenzyme gebildet, bei denen unter Aufrechterhaltung des modularen Organisationsprinzips die C-, A- und T-Domänen verschiedener Surfactin-Synthetase-Module neu miteinander rekombiniert wurden (Abb. 5.24 bis 5.26). Da die Existenz beweglicher Linkerregionen zwischen den funktionellen Domänen zum Zeitpunkt der Arbeit mit Ausnahme der Scharnierregion zwischen den beiden Adenylat-Subdomänen (Conti et al., 1996 und 1997) zwar vermutet wurde, deren Lage jedoch noch nicht genau lokalisiert war, erschien es am sinnvollsten, die Fusionierung vorrangig innerhalb hochkonservierter Sequenzmotive vorzunehmen und die variablen Bereiche als mutmaßliche Träger der Aminosäureerkennung unversehrt zu lassen. Die Hybridbildung wurde in allen drei Domärentypen C, A und T vorgenommen, um etwaige interdomänische Wechselwirkungen zu erfassen. In Abbildung 5.24 sind die in der vorliegenden Arbeit benutzten Fusionsstellen dargestellt, zur Motivation für die gewählten Rekombinationsstrategien sei auch auf das Kapitel 5. 3. 5 „Enzymatische Charakterisierung ...“ verwiesen.

5. 3. 4. 1 Konstruktion hybrider Surfactin-Synthetase-Module aus dem Valin-aktivierenden Modul Srf-M4 und dem Leucin-aktivierenden Modul Srf-M7

Ausgehend von dem vierten, L-Valin-aktivierenden Modul Srf-M4 und dem siebten, L-Leucin-aktivierenden Modul Srf-M7 wurden zunächst monomodulare Enzymsysteme konstruiert, bei denen schrittweise die C-terminalen Regionen gegeneinander ausgetauscht wurden (Abb. 5.25). Durch die reziproke Fusionierung innerhalb des Kondensations-Motivs C7 (Tab. 2.1) entstanden so die beiden hybriden Surfactin-Synthetase-Module Srf-M4/7_{CD} und Srf-M7/4_{CD} (CD steht für C-Domäne;). Analog führten Rekombinationen innerhalb der A-Domäne im Motiv A6 bzw. der Scharnierregion (engl. Hinge) zu den entsprechenden Hybridpaaren Srf-M4/7_{AD} / Srf-M7/4_{AD} bzw. Srf-M4/7_{ADH} / Srf-M7/4_{ADH} (Abb. 5.24 und 5.25).

suchung nunmehr auch die für die Aminoacylierung und Peptidelongation essentiellen Sequenzmotive T und His mit ein (Abb. 5.24).

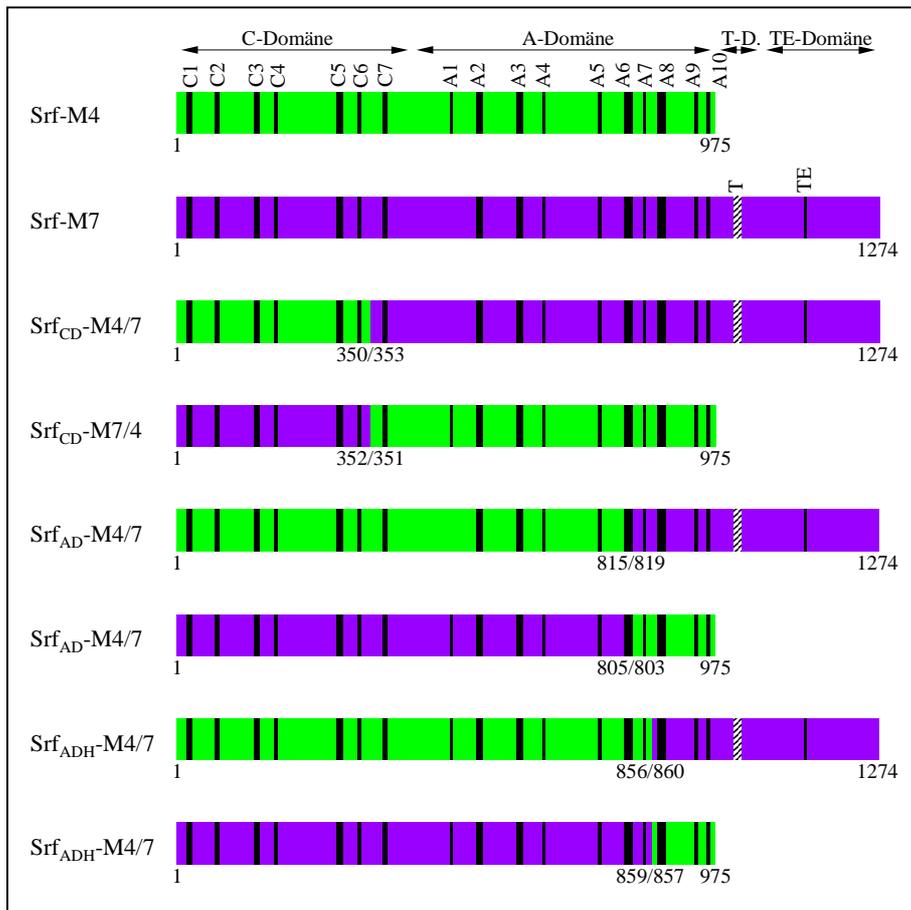


Abb. 5.25: Rekombinationsschema der monomodularen Hybride. Ausgehend von den beiden Modulen Srf-M4 (grün) und Srf-M7 (violett) wurden die dargestellten reziproken Hybride gebildet. Dabei beschreiben die Indizes die Lage der verwendeten Fusionsstelle: CD, C-Domäne, AD, A-Domäne, ADH, A-Domäne, Scharnier (engl. Hinge)-Region. Die Herkunft des N- bzw. C-terminalen Abschnitts ist durch die Aufzählung in der Enzymbezeichnung festgelegt. Unter den einzelnen Konstrukten sind die Aminosäurepositionen im Vergleich zu den entsprechenden Wildtypenzymen angegeben. Die hochkonservierten Sequenzmotive wurden mit Ausnahme des T-Motivs als schwarze Balken dargestellt, die Schraffur des T-Motivs steht für die Ser→Ala-Mutation.

Entsprechend fehlten den resultierenden hybriden Surfactin-Synthetasen Srf_{ADH}-M1/2-3 (A-Domäne, Hinge-Region), Srf_{TD}-M1/2-3 (T-Domäne) und Srf_{CDM}-M1-2/3 (C-Domäne, His-Motiv) die Areale zwischen den Scharnierregionen oder T-Motiven des ersten und zweiten Moduls bzw. den His-Motiven des zweiten und dritten Moduls (Abb. 5.26). Bei der Bezeichnung der bimodularen Enzyme wurden Mischmodule zur besseren Unterscheidung von den vollständig erhaltenen Modulen mit einem Schrägstrich gekennzeichnet. Im Gegensatz zu den übrigen drei Konstrukten wurde bei der vierten bimodularen Synthetase Srf_{AD}-M1-2/3 auf die Verwendung eines hochkonservierten Sequenzmotivs für die Hybridbildung verzichtet und statt dessen die Fusionsstelle unmittelbar in die Grenzregion

von der C- zur A-Domäne verlegt (Abb. 5.24 und 5.26), da kurz zuvor das Modul-Swapping in genau diesem Bereich zu einem aktiven Protein geführt hatte (Schneider et al., 1998a).

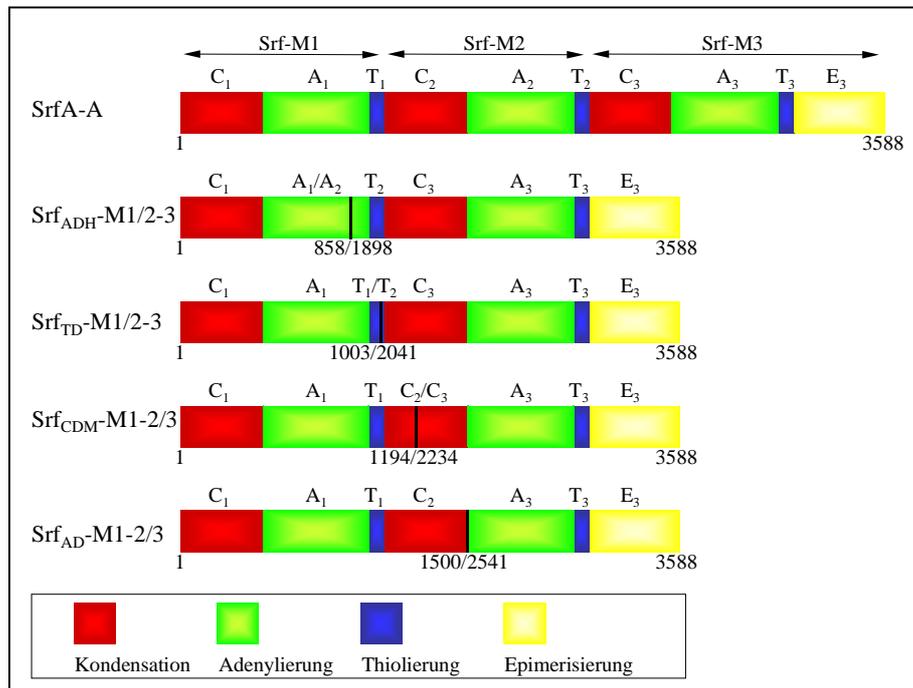


Abb. 5.26: Rekombinationsschema der bimodularen Hybride. Ausgehend von der trimodularen Surfactin-Synthetase SrfA-A wurden vier bimodulare Hybride durch Deletion der Bereiche zwischen den Scharnierregionen der Adenylat-Subdomänen (ADH-Typ) sowie den T-Motiven (TD-Typ) der Module Srf-M1 und Srf-M2 bzw. zwischen den His-Motiven (CDM-Typ) sowie den C-/A-domänischen Grenzregionen (AD-Typ) der Module Srf-M2 und Srf-M3 konstruiert. Die Fusionierung führte zur Bildung chimärer Domänen, die entsprechend gekennzeichnet wurden (A_{1/A₂}, T_{1/T₂}, C_{2/C₃}). Ebenfalls angegeben wurde auch die Abstammung der übrigen Domänen (oberhalb) sowie die Aminosäurepositionen im Vergleich zum SrfA-A-Wildtypenzym (unterhalb der Konstrukte).

5. 3. 4. 3 Heterologe Expression und Reinigung der mono- und bimodularen Hybridenzyme

Alle benötigten Genabschnitte wurden mittels PCR generiert, bei dem die jeweils im Expressionsvektor pQE-30 vorliegenden Gene (*pH-srf-M4*, *pH-srfA-C_{S1003A}* und *pH-srfA-A*) als Template dienen. Diese Plasmide boten den Vorteil, daß jeweils ein DNA-Fragment pro Konstrukt direkt mit dem Expressionsvektor amplifiziert werden konnte (Abb. 5.27) und sich somit die Zahl der zu ligierenden Komponenten reduzieren ließ. Konkret ergaben sich daraus für die monomodularen Konstrukte zwei und für die bimodularen Hybride theoretisch sogar nur noch ein zu amplifizierender Genabschnitt. Mit einer Gesamtgröße von 11 kb waren diese Fragmente aber relativ schwer zugänglich, so daß auch die bimodularen Hybride in zwei Teilabschnitten erzeugt wurden. Abbildung 5.27 veranschaulicht die Konstruktion der mono- und bimodularen Hybride am Beispiel der Plasmide *pH-srf_{ADH}-M4/7* und *pH-srf_{ADH}-M1/2-3*. Für die PCR ergaben sich in Abhängigkeit von der Fusionsstelle zwei unterschiedlich große Synthetase-Fragmente, von denen der Vektor dem jeweils kleineren unter Verwendung der Oligonukleotide GC_f und GC_r hinzugefügt wurde. Im Fall der in Abbildung 5.27 dargestellten

hybriden Synthetase *srf_{ADH}-M4/7* war dies der vom siebten Modul gestellte C-Terminus und umgekehrt bei *srf_{ADH}-M1/2-3* der N-Terminus.

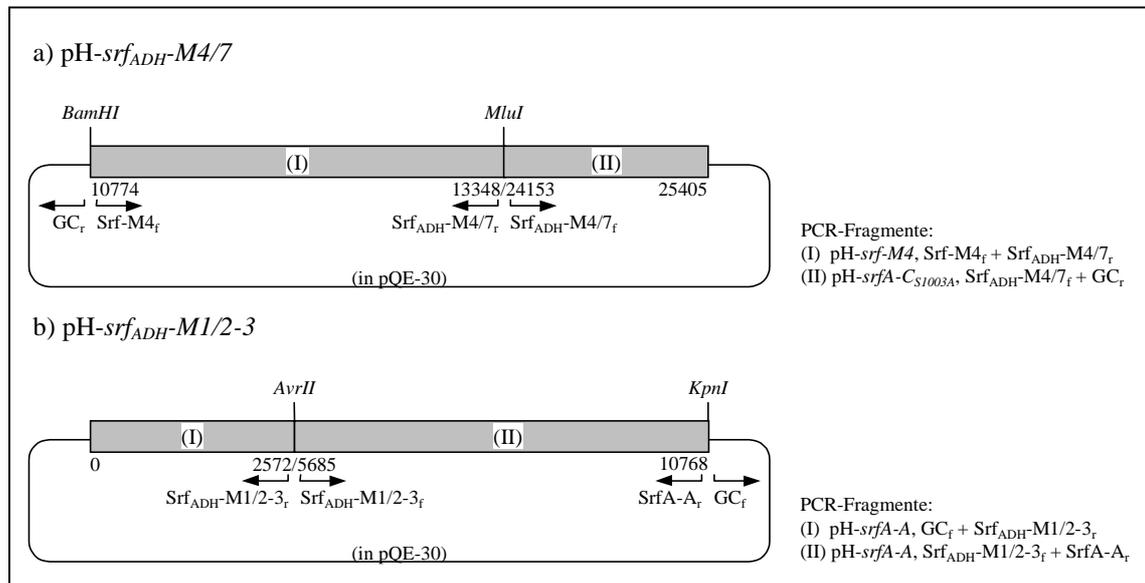


Abb. 5.27: Konstruktion der mono- und bimodularen Hybridenzyme am Beispiel der Plasmide pH-*srf_{ADH}-M4/7* (a) und pH-*srf_{ADH}-M1/2-3* (b). Mittels PCR wurden jeweils zwei DNA-Fragmente generiert, wovon stets ein Fragment direkt mit dem Expressionsvektor pQE-30 (GC_{f/r}-Primer) amplifiziert wurde. In der Regel handelte es sich dabei um die kleinere Synthetase-Komponente, wobei GC_r bei einem kleineren C-terminalen Fragment (z.B. Fragment II bei *srf_{ADH}-M4/7*) und umgekehrt GC_f bei einem kleineren N-terminalen Fragment (z.B. Fragment I bei *srf_{ADH}-M1/2-3*) verwendet wurde. Neben einer Ligationsstelle für die Vektorverknüpfung (*Bam*HI bzw. *Kpn*I) wurde den Fragmenten eine weitere Restriktionsschnittstelle (hier *Mlu*I bzw. *Avr*II) hinzugefügt, die eine Rekombination zwischen den korrespondierenden Genabschnitten ermöglichte.

Die Ligation der Vektor-DNA mit den korrespondierenden Synthetase-Genabschnitten wurde durch die Einführung einer *Bam*HI- (Abb. 5.27a: Srf-M4_f, ansonsten auch: Srf-M7_f, SrfAA_f) bzw. *Kpn*I-Schnittstelle (Abb. 5.27b: SrfAA_r, ansonsten auch: Srf-M4_r, Srf-M7_r) ermöglicht. Zur Rekombination der Surfactin-Synthetase-Abschnitte innerhalb der gewünschten Motive und Regionen wurde allen DNA-Fragmenten eine zusätzliche Restriktionsschnittstelle angefügt. Es kamen jedoch nur solche Restriktionseendonukleasen in Betracht, bei denen der Nukleotidaustausch keinen Einfluß auf die Aminosäuresequenz hatte, oder, soweit es sich nicht vermeiden ließ, ein bis zwei Aminosäuren homolog ausgetauscht wurden. Unter Kapitel 3. 3 (Tab. 3.4) sind die verwendeten Primer aufgelistet. Dabei erfolgte die Bezeichnung der Oligonukleotide jeweils in Anlehnung an das daraus resultierende Hybridenzym. Nach der Isolierung der PCR-Produkte wurden diese mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten und zu drei reziproken monomodularen Enzympaaren (Abb. 5.25) bzw. vier bimodularen Hybridsynthetasen (Abb. 5.26) ligiert.

Durch umfassende Restriktionsanalysen wurde die Richtigkeit sämtlicher Rekombinationen bestätigt. In Abbildung 5.28 sind repräsentativ die Restriktionen der monomodularen Hybride pH-*srf_{AD}-M4/7* und pH-*srf_{AD}-M7/4* sowie in Abbildung 5.29 die aller vier bimodularen Konstrukte einschließlich ihres Precursors pH-*srfA-A* dargestellt.

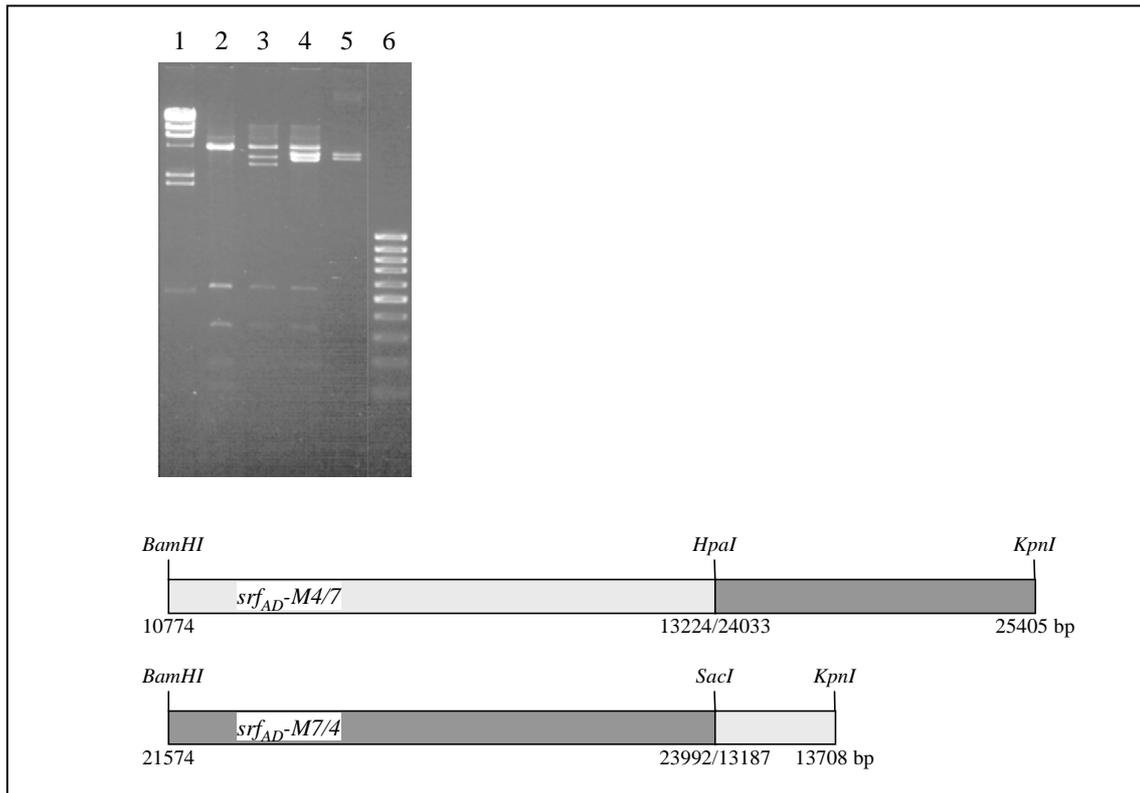


Abb. 5.28: Restriktionsanalyse der monomodularen Hybride pH-*srf*_{AD}-M4/7 und pH-*srf*_{AD}-M7/4. Die Spuren enthielten: 1, λ -Marker *Hind*III (von oben nach unten: 23000, 9416, 6557, 4631, 2322, 2027, 564, 125 bp); 2-5, pREP4-groESL; pH-*srf*_{AD}-M7/4 (2418 + 3440 bp); pH-*srf*_{AD}-M4/7 (3822 + 3440 bp); pH-*srf*_A-C_{S1003A} (3831 + 3440 bp) jeweils Doppelverdau mit *Bam*HI/*Kpn*I; 7, MBI-100bp-Marker. Die Fragmentgrößen berechneten sich zuzüglich des pQE-30-Expressionsvektors von 3440 bp.

In Abhängigkeit von der Herkunft des C-Terminus betrug die Größe der monomodularen Hybride 107 bzw. 140 kDa. Für die bimodularen Enzyme berechnete sich infolge der Deletion des SrfA-A-Proteins um 1037 bis 1040 Aminosäuren eine relative Molmasse von ca. 280 kDa. Die Verwendung eines N-terminalen Poly(His)₆-tags erlaubte eine schnelle und effiziente Aufreinigung der Wildtyp- und Hybridenzyme durch Affinitätschromatographie an Metallchelatsäulen. Die monomodularen Hybride wurden wie ihre Vorläuferenzyme mittels Perfusionschromatographie an POROS 20 MC Cu- bzw. Ni-Säulen gereinigt, bei der die Elution in einer Stufe mit 150 mM Imidazol erfolgte. Zur Unterdrückung unspezifischer Proteinwechselwirkungen enthielt der Säulenpuffer 200 mM NaCl. In Abbildung 5.30 ist die Isolierung der monomodularen Hybride dokumentiert.

Aufgrund ihrer Größe besaßen sowohl die bimodularen Hybridenzyme als auch das SrfA-A-Protein eine recht hohe Druckempfindlichkeit, die eine schonendere Aufreinigung gegenüber den monomodularen Systemen erforderte. Daher wurde zum einen der Maximaldruck für den French[®] Press-Zellaufschluß von 1000 auf 700 psi reduziert, zum anderen wurde während der chromatographischen Auftrennungen mit Fließgeschwindigkeiten von höchstens 1 ml/min gearbeitet.

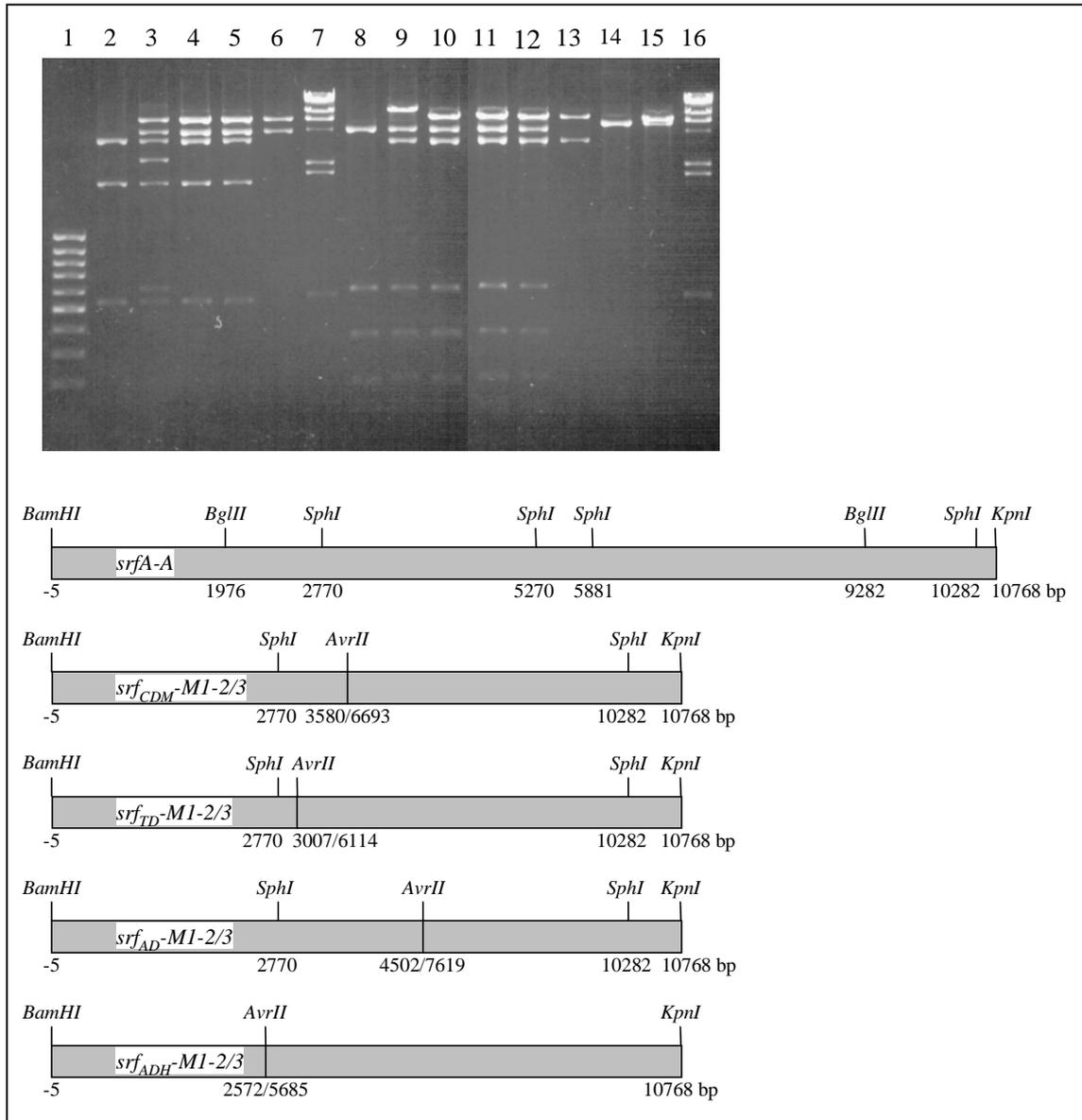


Abb. 5.29: Restriktionsanalyse der bimodularen Hybride pH-*srf_{ADH}-MI-2/3*, pH-*srf_{CDM}-MI-2/3*, pH-*srf_{TD}-MI-2/3* und pH-*srf_{AD}-MI-2/3* im Vergleich zu pH-*srfA-A*. Die Spuren enthielten: 1, MBI-100bp-Marker; 2-6, pREP4-groESL; pH-*srfA-A* (611 + 2500 + 4401 + 6701 bp); pH-*srf_{CDM}-MI-2/3* (4399 + 6701 bp); pH-*srf_{TD}-MI-2/3* (4405 + 6701 bp) und pH-*srf_{AD}-MI-2/3* (4395 + 6701 bp) jeweils *Sph*I; 7, λ -Marker *Hind*III (von oben nach unten: 23000, 9416, 6557, 4631, 2322, 2027, 564, 125 bp); 8-13, pREP4-groESL; pH-*srfA-A* (3440 + 10773 bp), pH-*srf_{ADH}-MI-2/3* (3440 + 7660 bp); pH-*srf_{CDM}-MI-2/3* (3440 + 7660 bp), pH-*srf_{TD}-MI-2/3* (3440 + 7666 bp) und pH-*srf_{AD}-MI-2/3* (3440 + 7656 bp) jeweils Doppelverdau mit *Bam*HI/*Kpn*I; 14-15, pREP4-groESL und pH-*srfA-A* (6907 + 7306 bp) jeweils *Bgl*III; 16, λ -Marker *Hind*III. Die Fragmentgrößen berechneten sich zuzüglich des pQE-30-Expressionsvektors.

Die Proteinisolierung umfaßte zwei Reinigungsstufen, erstens die Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Agarose und zweitens die Gelfiltration an Ultrogel[®] AcA 34 (Ausschlußvolumen 350 kDa für SrfA-A) bzw. Sephacryl[®] S-200 HR (Ausschlußvolumen 250 kDa für bimodulare Enzyme). Vor der Gelfiltration wurden die Proteinlösungen durch eine Ammoniumsulfatfällung bis zu 60 % Sättigung angereichert. Die so gereinigten Proteinlösungen wurden abschließend durch Ultrafiltration mit einer 100 kDa-Membran auf eine

Endkonzentration von 1 bis 2 mg/ml eingestellt. Abbildung 5.31 zeigt die gereinigten bimodularen Enzyme im Vergleich mit SrfA-A.

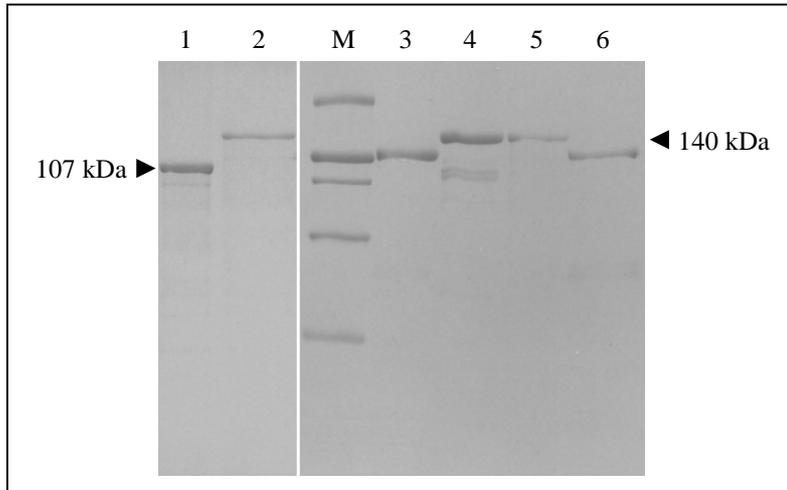


Abb. 5.30: SDS-Page der durch Perfusionschromatographie an einer POROS 20 MC Cu- bzw. Ni-Säule (jeweils in Klammern angegeben) gereinigten monomodularen Hybride. Es wurden jeweils 3 μ g Protein auf ein 10 %iges SDS-Gel aufgetragen, die Spuren enthielten: 1, Srf_{CD}-M7/4 (Cu); 2, Srf_{CD}-M4/7 (Cu); 3, Srf_{ADH}-M7/4 (Cu); 4, Srf_{ADH}-M4/7 (Cu); 5, Srf_{AD}-M4/7 (Cu); 6, Srf_{AD}-M7/4 (Ni); M, High Range-Proteinmarker (von oben nach unten: 200, 116, 97, 66, 45 kDa).

Es fiel auf, daß in allen Enzympräparationen eine „Leiter“ von kürzeren Proteinbanden zu beobachten war, die selbst nach der Gelfiltration nicht verschwanden. Die Herkunft dieser Banden blieb jedoch auch nach der Zugabe von Proteaseinhibitoren und der Verwendung proteasedefekter [lon⁻] *E. coli*-Stämme SG 1087 und JB 3034 sowie der Anwendung eines drucklosen Lysozym-Aufschlusses spekulativ, da somit Proteasen und mechanische Brüche während des French[®] Press-Aufschlusses als Ursache unwahrscheinlicher wurden. Denkbar wäre, daß die Stabilität der heterolog exprimierten Proteine trotz der Unterstützung durch die *E. coli*-Chaperone nicht ausreichte. Es konnte aber auch nicht ausgeschlossen werden, daß es sich dabei um Proteine handelte, bei denen die Proteinsynthese vorzeitig terminiert wurde.

Trotz wiederholter Versuche war es nicht möglich, den Ligationsansatz für das bimodulare Hybridenzym Srf_{AD}-M1-2/3 in den *E. coli*-Stamm DH5 α [pREP4-groESL] zu transformieren. Erst durch die Verwendung hocheffizienter ultrakompetenter Zellen Epicurian Coli[®] XL2-Blue (*Stratagene*) gelang die Identifizierung eines positiven Klons. Auf die Umtransformation in den Stamm DH5 α [pREP4-groESL] wurde dennoch verzichtet, da durch diesen Stamm eine ausreichend große Menge an Protein exprimiert wurde. Folglich fehlten diesem Konstrukt sowohl im SDS-Page als auch in der Restriktionsanalyse die entsprechenden Gro-Banden (Abb. 5.29 und 5.31).

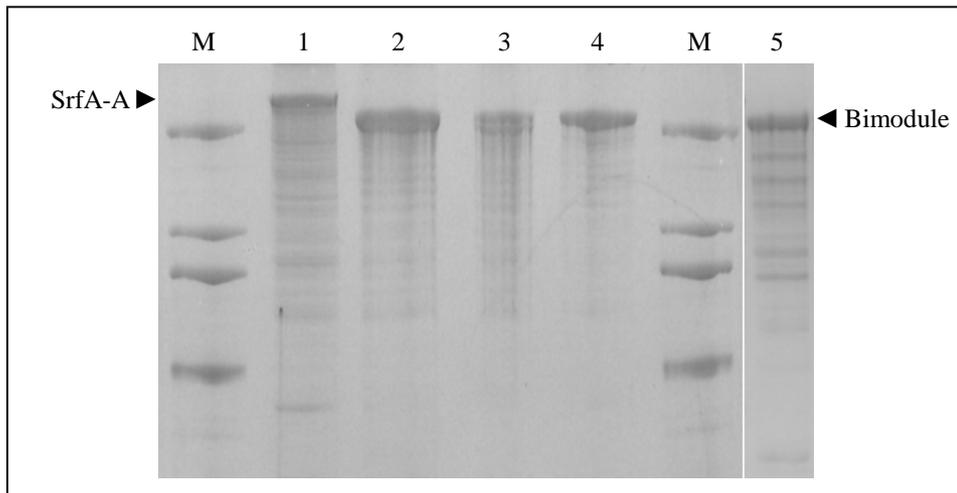


Abb. 5.31: Isolierung von SrfA-A und der bimodularen Hybride. Mit Ausnahme von Srf_{AD}-M1-2/3 wurden alle Enzyme mit den *E. coli*-Chaperonen GroES/EL coexprimiert, die weder durch Affinitätschromatographie noch durch Gelfiltration völlig abgetrennt werden konnten. Jeweils 5 µg Protein wurden auf ein 10 %iges Gel aufgetragen. Die Spuren enthielten: 1, SrfA-A; 2, Srf_{TD}-M1/2-3; 3, Srf_{CDM}-M1-2/3; 4, Srf_{ADH}-M1/2-3; 5, Srf_{AD}-M1-2/3; M, High Range-Proteinmarker (von oben nach unten: 200, 116, 97, 66 kDa).

5. 3. 5 Enzymatische Charakterisierung von SrfA-A und Konsequenzen des Protein-Engineerings auf die Adenylierungs- und Thiolierungsfunktion der rekombinanten Enzyme

Als vorläufige Kriterien für die Eignung der Fusionsstellen wurden die Adenylierungs- und die Thiolierungsfunktionen der gereinigten Hybridenzyme analysiert und mit den Enzymaktivitäten der entsprechenden Wildtypenzyme verglichen (Tab. 5.6 bis 5.8). Dazu wurden zunächst die Enzymfunktionen (Adenylierung und Thioesterbeladung) der trimodularen Surfactin-Synthetase SrfA-A untersucht, bei der neben den Hauptsubstraten L-Glutaminsäure (Srf-M1) und L-Leucin (Srf-M2 und -M3) auch D-Leucin und die übrigen Bausteinamino-säuren des fertigen Surfactins, L-Valin und L-Asparaginsäure sowie das Substratanalogon L-Isoleucin, berücksichtigt wurden (Tab. 5.7 und 5.8).

Im ATP-PP_i-Austausch konnte von den getesteten L-Aminosäuren außer den erwarteten Reaktionen mit L-Glutaminsäure und L-Leucin keine andere Nebenaktivität nachgewiesen werden (Tab. 5.7). Wie bereits schon bei den Einzelmodulen festgestellt wurde (Tab. 5.2), lag die spezifische Aktivität der Glutaminsäure-Aktivierung wiederum deutlich unter Ergebnissen der anderen Module. Während theoretisch ein Verhältnis der L-Glu:L-Leu-Aktivierung von 1:2 erwartet wurde, betrug das tatsächliche Verhältnis 1:7 (Ta. 5.7). Unter der vereinfachten Annahme, daß beide Leucin-aktivierenden Module dieselbe Enzymaktivität besaßen, resultierte daraus ein Defizit der Glutaminsäure-Aktivierung um den Faktor 3,5. Daneben fiel auf, daß die Größenordnung der spezifischen Aktivitäten im ATP-PP_i-Austausch gegenüber den Einzelmodulen um eine Zehnerpotenz verringert war, was sich bereits in der einzusetzenden Enzymmenge von 50 pmol äußerte (Tab. 5.2 und 5.7). Wie zuvor schon von verschiedenen Autoren berichtet, wurden mit dem ATP-Analogon dATP schließlich nur noch

Enzymaktivitäten von etwa 30 % gemessen. Überraschend wurde im ATP-PP_i-Austausch auch D-Leucin als Substrataminosäure erkannt und aktiviert (Tab. 5.7), obwohl das dritte Modul Srf-M3 eine Epimerasefunktion besitzt. Im Vergleich zur L-Glu-Adenylierung betrug dessen relative Aktivität 20 %.

Mit Hilfe der heterolog exprimierten 4'-PPT-ase Sfp wurde die Thioesterbeladung des gereinigten SrfA-A-Proteins getestet, bei dem sich in den Ergebnissen von rund 31 % für L-Glutaminsäure und 64 % für L-Leucin das molare Verhältnis der drei Surfactin-Bausteine widerspiegelte (Tab. 5.8).

In den folgenden Kapiteln sollen nunmehr die Ergebnisse der verschiedenen Rekombinationsstrategien einzeln dargestellt werden.

5. 3. 5. 1 Rekombination innerhalb der A-Domäne

Basierend auf den Erfolgen vorangegangener Arbeiten (Elsner et al., 1997) schien es zunächst sinnvoll, die Hybridbildung innerhalb des hochkonservierten GEL(C/Y)IGGxGLARGYL-Motivs (Tab. 2.1; Motiv A6) vorzunehmen, woraus die reziproken Hybride Srf_{AD}-M4/7 und Srf_{AD}-M7/4 entstanden (Abb. 5.24 und 5.25). Während im ATP-PP_i-Austausch die L-Leucin-Aktivierung von Srf_{AD}-M7/4 mit etwa 2 % im Vergleich zu SrfA-C_{S1003A} (Tab. 5.2) zwar drastisch reduziert, aber dennoch meßbar war, konnte in dem reziproken Gegenstück keinerlei Aktivität mehr nachgewiesen werden (Tab. 5.6). Daher wurde von weiteren Arbeiten an diesem Hybridtyp abgesehen und die Fusionsstelle des nächsten reziproken Hybridpaares um ca. 40 Aminosäuren zum C-Terminus verschoben (Abb. 5.24 und 5.25). Nach Erkenntnissen aus den beiden verwandten Kristallstrukturen befindet sich dort eine flexible Scharnierregion, die die A-Domäne in eine große N-terminale und eine kleine C-terminale Subdomäne unterteilt (siehe auch Anhang 3).

Tab. 5.6: Enzymatische Charakterisierung der monomodularen Hybridenzyme im ATP-PP_i-Austausch.

Enzym	MW (kDa)	Spezifische Aktivität (cpm/h × pmol)	Substratspezifität
Srf _{AD} -M4/7	140	n.n.	-
Srf _{AD} -M7/4	108	2400 ± 200	L-Leu
Srf _{ADH} -M4/7	140	5600 ± 800	L-Val
Srf _{ADH} -M7/4	108	9500 ± 100	L-Leu
Srf _{CD} -M4/7	140	n.n.	-
Srf _{CD} -M7/4	108	n.n.	-

Die spezifischen Aktivitäten wurden mit den Aminosäuren L-Valin bzw. L-Leucin im linearen Reaktionsbereich bestimmt. Jeder Wert wurde aus mindestens drei Messungen ermittelt. n.n., nicht nachweisbar

Beide resultierenden Enzyme Srf_{ADH}-M4/7 und Srf_{ADH}-M7/4 (Abb. 5.24 und 5.25) waren im ATP-PP_i-Austausch aktiv, wenngleich mit erheblich verminderten spezifischen Aktivitäten (5 % für Srf_{ADH}-M4/7 und 10 % für Srf_{ADH}-M7/4 im Verhältnis zu den entsprechenden Wild-

typenzymen; Tab. 5.2 und 5.6). Wie bereits bei dem Hybrid Srf_{AD}-M7/4 beobachtet wurde, teilte dabei das Enzym mit dem N-terminalen Srf-M7-Ursprung Srf_{ADH}-M7/4 die L-Leucin-Spezifität mit Srf-M7, während umgekehrt die L-Valin-Spezifität von Srf_{ADH}-M4/7 durch dessen Srf-M4-N-Terminus festgelegt wurde (Tab. 5.6).

Unter Anwendung dieser Ergebnisse sollte diese Rekombinationsstrategie auch auf ein bimodulares System übertragen werden. Es wurde das Hybridenzym Srf_{ADH}-M1/2-3 konstruiert, bei dem die Scharnierregionen des ersten und zweiten SrfA-A-Moduls miteinander fusioniert wurden (Abb. 5.24). Die resultierende rekombinante Peptidsynthetase enthielt somit eine chimäre A-Domäne A_{1/2}, die N-terminal mit der ersten C-Domäne C₁ und C-terminal mit der zweiten T-Domäne T₂ verknüpft war, das dritte, D-Leucin-aktivierende Modul Srf-M3 blieb von dieser Hybridbildung unberührt (Abb. 5.24 und 5.26). Auch dieses bimodulare Hybridenzym zeigte im ATP-PP_i-Austausch Enzymaktivitäten mit den drei Aminosäuren L-Glutaminsäure, L- und D-Leucin (Tab. 5.7). Mit einer relativen Aktivität von 69 % der L-Glutaminsäure-Aktivierung gegenüber SrfA-A bestätigte sich auch im Fall der bimodularen Hybridbildung die Abhängigkeit der Aminosäurespezifität von der N-terminalen Subdomäne.

Tab. 5.7: Enzymaktivitäten von SrfA-A und den bimodularen Hybridenzymen im ATP-PP_i-Austausch.

Enzym	MW (kDa)	Spezifische Aktivität (cpm/h × 10 pmol)	
		mit ATP	mit dATP ^a
SrfA-A	402	Glu: 68000 ± 6000 Leu: 485000 ± 13000 D-Leu: 14000 ± 900 Val, Asp, Ile: n.n.	Glu: 18000 ± 2000 Leu: 163000 ± 11000 D-Leu: n.n.
Srf _{ADH} -M1/2-3	280	Glu: 47000 ± 6000 Leu: 100000 ± 4000 D-Leu: 13000 ± 2000	Glu: 11000 ± 2000 Leu: 110000 ± 6000 D-Leu: 20000 ± 2000
Srf _{TD} -M1/2-3	280	Glu: 54000 ± 3000 Leu: 140000 ± 11000 D-Leu: 9000 ± 1000	Glu: 32000 ± 3000 Leu: 144000 ± 15000 D-Leu: 8600 ± 1700
Srf _{CDM} -M1-2/3	280	Glu: 132000 ± 22000 Leu: 168000 ± 13000 D-Leu: 10000 ± 3000	Glu: 29000 ± 7000 Leu: 147000 ± 30000 D-Leu: 8600 ± 3400
Srf _{AD} -M1-2/3	280	Glu: 485000 ± 117000 Leu: 1700 ± 600 D-Leu: n.n.	Glu: 47000 ± 12000 Leu: n.n. D-Leu: n.n.

Die spezifischen Aktivitäten wurden mit den Aminosäuren L-Glutaminsäure, L-Leucin und D-Leucin in Kombination mit den Nukleotidsubstraten ATP und dATP im linearen Reaktionsbereich bestimmt. Jeder Wert wurde aus mindestens drei Messungen ermittelt. n.n., nicht nachweisbar

^a Der ATP-PP_i-Austausch wurde mit 0,5 mM dATP anstelle von 0,5 mM ATP durchgeführt.

Darüber hinaus wurde aufgrund der Deletion des mittleren Moduls Srf-M2 ein Rückgang der L-Leucin-Aktivierung um etwa 50 % erwartet, tatsächlich wurde jedoch eine Reduktion der Enzymaktivität um etwa 79 % bestimmt. Unter Berücksichtigung der Tatsache, daß das dritte

Modul Srf-M3 durch die Rekombination nicht modifiziert wurde, mußte folglich das Modul Srf-M2 einen größeren Beitrag zur L-Leucin-Gesamtaktivität liefern als das Srf-M3-Modul. Die nahezu unveränderte D-Leucin-Aktivierung bestätigte die Unversehrtheit des letzten Moduls. Anders als bei dem Wildtypenzym SrfA-A reduzierte sich bei dem Einsatz des Nukleotids dATP nur die Glutaminsäure-Aktivierung auf etwa ein Viertel, die übrigen Aktivitäten blieben gegenüber den ATP-Referenzwerten mehr oder weniger identisch oder erhöhten sich sogar (Tab. 5.7).

Zur Überprüfung der Thiolierungsfunktion des bimodularen Hybrids Srf_{ADH}-M1/2-3 wurde nach der *in vitro*-Phosphopantetheinylierung mit dem heterolog exprimierten M-Sfp-Protein die Beladung mit den [¹⁴C]-markierten Aminosäuren L-Glutaminsäure und L-Leucin gemessen (Tab. 5.8). Während sich der L-Leucin-Wert infolge der Deletion erwartungsgemäß annähernd halbierte, konnte mit L-Glutaminsäure keine Beladung mehr nachgewiesen werden. Daraus folgte, daß durch die Hybridbildung entweder die Wechselwirkungen zwischen der T₂-Domäne und der Glutaminsäure-spezifischen Hybrid-Domäne A_{1/2} gestört wurden oder die T₂-Domäne unfähig war, das Glutamyladenylat zu erkennen.

5. 3. 5. 2 Rekombination innerhalb der T-Domäne

Die Beeinträchtigung der Thiolierungsfunktion durch die Fusionierung innerhalb der A-Domäne erforderte die Suche alternativer Rekombinationsstrategien. Dazu wurde zunächst die Möglichkeit der Hybridbildung innerhalb der T-Domäne geprüft. Als Fusionsstelle wurde das für die 4'-Phosphopantetheinbindung verantwortliche D(D/N)FFxLGGHS(L/I)-Motiv benutzt, wodurch ein chimäres PCP-Motiv entstand (Abb. 5.24 und 5.26). Für das Hybridenzym Srf_{TD}-M1/2-3 resultierte daraus eine Domänen-Organisation von C₁-A₁-T_{1/2}-C₃-A₃-T₃-E₃, das letzte Modul Srf-M3 blieb wiederum unverändert. Bei der Charakterisierung des gereinigten Hybridenzym ergaben sich im ATP-PP_i-Austausch ähnliche Ergebnisse wie bei Srf_{ADH}-M1/2-3, die relativen Aktivitäten betragen 79 % für L-Glutaminsäure, 29 % für L-Leucin und 65 % für D-Leucin (Tab. 5.7). Eine Beeinflussung der Adenylierungsfunktionen beider A-Domänen konnte daher mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden.

Der zweite Augenmerk wurde auf die Analyse der Aminosäurebeladung nach der *in vitro*-Coinkubation mit dem gereinigten M-Sfp-Protein gerichtet (Tab. 5.8). Es konnte nachgewiesen werden, daß mit beiden Aminosäuren Thioester gebildet wurden. Mit rund 33 % entsprach die Beladung mit L-Glutaminsäure näherungsweise dem Wildtypergebnis, während die L-Leucin-Aktivierung trotz des fehlenden mittleren Moduls beinahe den SrfA-A-Wert erreichte (55 %; Tab. 5.8). Im Gegensatz zu Srf_{ADH}-M1/2-3 war demnach die chimäre T_{1/2}-Domäne in der Lage, das Glutamyladenylat der A₁-Domäne zu erkennen und genügte somit den genannten Kriterien des Protein-Engineerings.

Tab. 5.8: Thioesterbeladung von SrfA-A und den bimodularen Hybridenzymen mit den Substrat-aminosäuren L-Glutaminsäure und L-Leucin.

Enzym	TE-Beladung mit L-Glu (%)		TE-Beladung mit L-Leu (%)	
	ohne Sfp	mit Sfp	ohne Sfp	mit Sfp
SrfA-A	8,9 ± 0,1	30,6 ± 1,4	11,7 ± 0,3	64,3 ± 1,6
Srf _{ADH} -M1/2-3	3,3 ± 0,1	4,4 ± 0,6	4,9 ± 0,3	38,9 ± 0,2
Srf _{TD} -M1/2-3	2,4 ± 0,1	32,6 ± 0,9	5,2 ± 0,2	54,7 ± 0,8
Srf _{CDM} -M1-2/3	10 ± 0,3	40,8 ± 0,6	6,7 ± 0,3	35,3 ± 0,4
Srf _{AD} -M1-2/3	9,2 ± 0,4	54,6 ± 1,4	1,2 ± 0,1	4,9 ± 0,2

Die Beladung wurde in Abwesenheit und Gegenwart von Sfp bestimmt. Jeder Wert wurde aus mindestens drei Messungen ermittelt.

5. 3. 5. 3 Rekombination innerhalb der C-Domäne

Bereits durch die Entfernung der kompletten C-Domänen in den Modulen Srf-NΔM1 (Tab. 5.2) und Srf-NΔM4 (Elsner et al., 1997) war die essentielle Bedeutung dieser Bausteine für die Funktionalität der Peptidsynthetasen nachgewiesen worden. Daher wurde als dritte Möglichkeit des Protein-Engineerings die Fusionierung innerhalb der C-Domäne analysiert, bei der die C-Domäne als solche für das rekombinante Enzym erhalten blieb. Zunächst wurden wieder reziproke Hybride zwischen den Modulen Srf-M4 und Srf-M7 gebildet. Als Fusionsstelle wurde dabei die Region des konservierte Motivs C7 gewählt, welches sich etwa 140 Aminosäuren vor dem ersten konservierten Motiv A1 der C-terminalen A-Domäne befindet (Abb. 5.24 und 5.25). Obwohl durch die Hybridbildung die jeweiligen A-Domänen nicht verändert wurden, konnte im ATP-PP_i-Austausch für keines der beiden Hybride Srf_{CD}-M4/7 und Srf_{CD}-M7/4 Adenylierungsaktivität nachgewiesen werden (Tab. 5.6). Das ergab die Vermutung, daß weniger die Größe der C-Domänen sondern eher bestimmte Aminosäuren die katalytische Funktion der benachbarten A-Domänen beeinflussen.

Anfang 1998 publizierten Mitarbeiter der Marburger Arbeitsgruppe den erfolgreichen Versuch, das mittlere, Leucin-aktivierende Modul Srf-M2 der Surfactin-Synthetase gegen das vierte, Ornithin-aktivierende Modul der Gramicidin-Synthetase Grs-M4 zu ersetzen (Schneider et al., 1998a). Im Gegensatz zu unseren Arbeiten verwendeten sie für das Modul-Swapping aber kein komplettes Modul, sondern nur einen Minimalausschnitt von etwa 635 Aminosäuren. Als N-terminale Fusionsstelle wählten sie dabei eine Region, die etwa 28 Aminosäuren vor dem konservierten A1-Motiv lag und damit näherungsweise die Grenzregion von der C- zur A-Domäne repräsentierte. Folgerichtig wurde für den nächsten Rekombinationsversuch deren Fusionsstelle übernommen, bei dem das bimodulare Hybridenzym Srf_{AD}-M1-2/3 entstand (Abb. 5.24 und 5.26). Durch die direkte Verknüpfung der C₂-Domäne mit der übernächsten A₃-Domäne (C₁-A₁-T₁-C₂-A₃-T₃-E₃) betraf die Manipulation nunmehr das dritte, Leucin-aktivierende Modul Srf-M3. Wie zuvor bei den monomodularen Konstrukten wurde auch hier eine starke Beeinflussung der Enzymaktivitäten festgestellt (Tab. 5.7). Im ATP-PP_i-Austausch wurden mit L-Leucin nur noch Spuren von Adenylierungsaktivität detektiert (0,3 % relative Aktivität) und mit D-Leucin war sogar

überhaupt keine Aktivität mehr meßbar. Dagegen wurde für die Adenylierung von L-Glutaminsäure ein unerwartet hoher Anstieg der Enzymaktivität verzeichnet, diese betrug mehr als das Siebenfache der Wildtypaktivität und war damit identisch mit den Ergebnissen des separat exprimierten Moduls Srf-M1 (Tab. 5.7 und 5.2). Ähnliche Effekte zeigten sich auch bei der Analyse der Thioesterbeladung (Tab. 5.8). Ohne die notwendige Adenylierung des L-Leucin-Restes durch die rekombinante Peptidsynthetase konnte zwangsläufig auch kein Thioester gebildet werden, nach der Coinkubation mit Sfp unterschieden sich die Ergebnisse kaum von der Grundbeladung ohne Sfp. Weniger drastisch als beim ATP-PP_i-Austausch zeigte sich die Erhöhung der Thioesterbeladung mit L-Glutaminsäure, gegenüber dem Srf-M1-Modul innerhalb der trimodularen Peptidsynthetase SrfA-A stieg die Aktivität „nur“ um den Faktor 2. Ursache der enormen Aktivitätsverluste bei der Leucin-Aktivierung war vermutlich ähnlich wie bei den reziproken Hybridenzymen Srf_{CD}-M4/7 und Srf_{CD}-M7/4 die Aufhebung domänenspezifischer Wechselwirkungen zwischen den benachbarten C- und A-Domänen. Aufgrund der starken Beeinträchtigungen der Enzymfunktionen erschien eine weitere Untersuchung C-terminal lokalisierter Fusionsstellen innerhalb der C-Domäne einschließlich der bei Marahiel und Mitarbeitern als erfolgreich getesteten C-/A-Grenzregion nicht sinnvoll.

Als letzte Variante der Hybridbildung wurde das hochkonservierte His-Motiv (Tab. 2.1) analysiert, welches sich in relativ konstanter Entfernung (ca. 170–190 Aminosäuren; de Crécy-Lagard et al., 1995) von der Cofaktor-Bindungsstelle befindet. Es wurde das bimodulare Hybrid Srf_{CDM}-M1-2/3 konstruiert (Abb. 5.24 und 5.26), bei dem sich N-terminal zur A₃-Domäne eine chimäre C_{2/3}-Domäne befand, das erste Modul Srf-M1 wurde bei dieser Hybridbildung nicht verändert. Damit ergab sich insgesamt eine Organisation der Domänen in der Reihenfolge C₁-A₁-T₁-C_{2/3}-A₃-T₃-E₃. Anders als bei der vorher betrachteten rekombinanten Synthetase wurden durch die Manipulation weder die Adenylierungs- noch die Thioesterfunktion des hybriden D-Leucin-Moduls nachhaltig beeinträchtigt (Tab. 5.7). Im ATP-PP_i-Austausch betrug die relativen Aktivitäten im Verhältnis zu SrfA-A 35 % für L-Leucin und 73 % für D-Leucin und zeigten damit eine recht gute Übereinstimmung mit den Adenylierungsfunktionen des bimodularen Hybrids Srf_{TD}-M1/2-3 (Tab. 5.7). Bei der Analyse der Thioesterbeladung mit L-Leucin wurde zwar eine Halbierung des SrfA-A-Referenzwertes beobachtet, was aber mit Sicherheit auf die Deletion eines kompletten Leucin-Moduls zurückzuführen war (Tab. 5.8). Bezüglich der L-Glutaminsäure-Aktivierung war in beiden Teilreaktionen der Aufwärtstrend gegenüber dem Wildtypenzym bereits zu erkennen, der sich in dem zuvor beschriebenen Hybrid Srf_{AD}-M1-2/3 weiter manifestierte (Tab. 5.7 und 5.8). Die Stetigkeit dieses Phänomens ließ vermuten, daß die katalytischen Funktionen des L-Glutaminsäure-Aktivierungsmoduls eng mit ihrer Domänen-Umgebung assoziiert sind.

5.4 *In vivo*-Rekombination von Surfactin-Synthetase-Genen in *B. subtilis* und Charakterisierung der resultierenden Deletions- und Austauschmutanten der Surfactin-Synthetase

Durch die vorangegangene systematische *in vitro*-Rekombination wurden mit dem T- und dem His-Motiv (Tab. 2.1) zwei Fusionsstellen lokalisiert, die für die Umstrukturierung der Peptidsynthetasen geeignet erschienen. Für eine endgültige Beurteilung fehlte jedoch die Analyse der dritten katalysierten Reaktion: der Peptidbindung.

Die dünnschichtchromatographische Untersuchung der *in vitro*-Peptidsynthese schied zur Beantwortung dieser Frage aufgrund fehlender radioaktiv markierter Lipodi- und Lipotriptide als Referenzmaterialien aus, lieferte aber dennoch einen ersten Verdacht auf die katalytische Aktivität der rekombinanten Peptidsynthetasen. Bei der Auftragung der Biosynthese-Reaktionen mit [¹⁴C]-markierter L-Glutaminsäure wurde ein negatives Resultat nicht nur im Fall von Srf_{ADH}-M1/2-3 sondern überraschend auch für Srf_{TD}-M1/2-3 detektiert. Im Gegensatz dazu waren vergleichbare Bandenmuster für Srf_{CDM}-M1-2/3 und SrfA-A ein klares Indiz für die Funktionsfähigkeit des hybriden His-Motivs (Abb. 5.32).

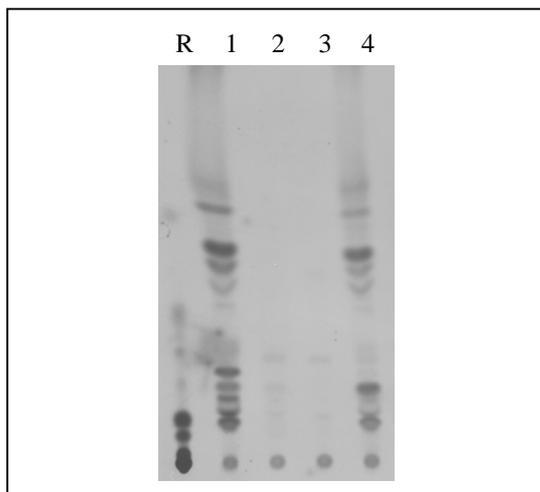


Abb. 5.32: Dünnschichtchromatographische Analyse der *in vitro*-Peptidsynthese von SrfA-A (Spur 1) und den bimodularen Hybriden Srf_{TD}-M1/2-3, Srf_{ADH}-M1/2-3 und Srf_{CDM}-M1-2/3 (Spuren 2 bis 4). Die Biosynthese wurde entsprechend der im Methodenteil beschriebenen Vorschrift durchgeführt, zur Initiation der Reaktion wurde jedem Ansatz 160 μ M 3-Hydroxytetradecanoyl-Coenzym A zugefügt. Es wurden jeweils 50 μ l des Reaktionsgemisches auf eine Kieselgelplatte aufgetragen und mit dem Fließmittel 4 chromatographiert, als Referenz (R) diente [¹⁴C]-L-Glutaminsäure. Vermutlich handelte es sich bei den verschiedenen Banden der SrfA-A- und Srf_{CDM}-M1-2/3-Reaktionen um diverse Zwischenprodukte zwischen der aktivierten β -Hydroxymyristinsäure und den beiden Aminosäuren.

5.4.1 *In vivo*-Rekombination von Surfactin-Synthetase-Genen in *B. subtilis*

Als Alternative für die Klärung der Biosynthese-Aktivitäten bot sich die *in vivo*-Rekombination der manipulierten Surfactin-Synthetase-Gene in das *B. subtilis*-Chromosom an, bei der der Einbau der hybriden Genfragmente mit Hilfe von Integrationsplasmiden und

zwei aufeinanderfolgenden Rekombinationsschritten zwischen den komplementären DNA-Sequenzen der SrfA-A-Module Srf-M1 und Srf-M3 erfolgte (Abb. 5.33 und 5.36). Dabei interessierten nicht nur die Auswirkungen durch die Deletion des mittleren, L-Leucin-aktivierenden Moduls, sondern auch durch dessen Substitution mit einem anderen innerständigen Peptidsynthetase-Modul. Als naheliegendste Lösung wurde dafür das L-Asparaginsäure-aktivierende Modul Srf-M5 der Surfactin-Synthetase SrfA-B gewählt.

Den Ausgangspunkt der *in vivo*-Rekombination bildeten die Gene der beiden zuvor ausführlich beschriebenen bimodularen Hybridsynthetasen Srf_{TD}-M1/2-3 und Srf_{CDM}-M1-2/3, die für die Transformation des Surfactin-produzierenden Wildtyps *B. subtilis* ATCC 21332 in den Integrationsplasmidvektor pMMN13 (Nakano and Zuber, 1989) gebracht werden mußten (Abb. 5.33).

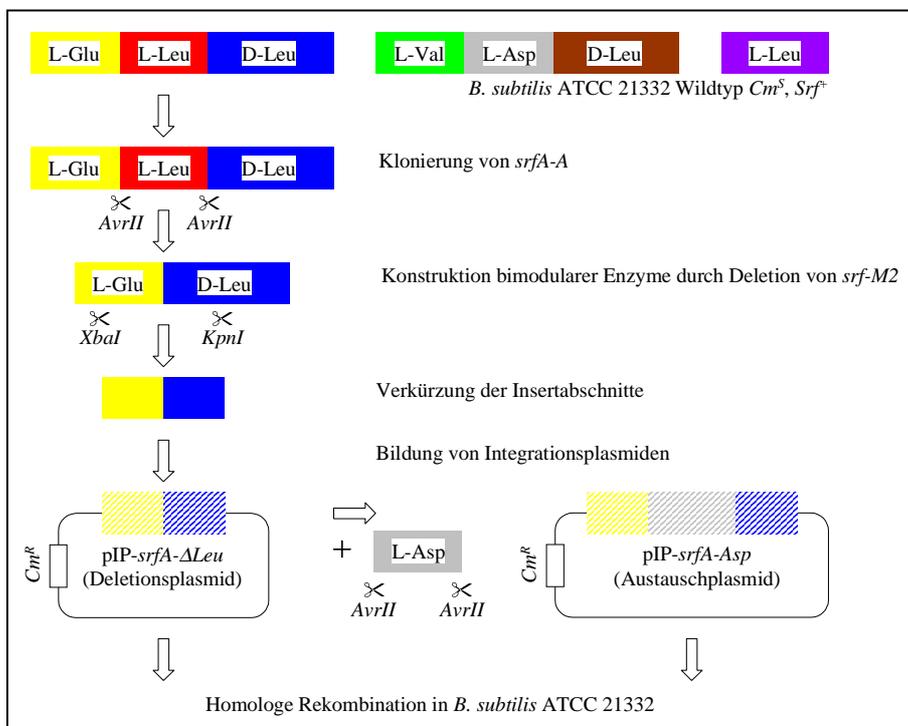


Abb. 5.33: Allgemeines Konstruktionsschema zur Darstellung der Integrationsplasmide pIP-*srfA*- Δ Leu und pIP-*srfA*-Asp für die homologe Rekombination in *B. subtilis* ATCC 21332 (gültig sowohl für Fusionsstellen vom TD- als auch vom CDM-Typ). Ausgehend von der trimodularen Surfactin-Synthetase SrfA-A wurden die in Kapitel 5. 3. 4 und 5. 3. 5 beschriebenen bimodularen Hybridenzyme geschaffen. Nach Verkürzung der Insertabschnitte wurden die Gene der bimodularen Synthetasen in den Integrationsplasmidvektor pMMN13 (mit Chloramphenicolresistenz-Gen Cm^R als Selektionsmarker) kloniert. Die entstandenen Deletionsplasmide (pIP-*srfA*- Δ Leu) wurden entweder direkt zur Rekombination in *B. subtilis* ATCC 21332 eingesetzt oder durch Einschub des fünften, Asparaginsäure-aktivierenden Moduls zu Austauschplasmiden (pIP-*srfA*-Asp) erweitert. Das in der Abbildung vereinfacht als Srf-M2 (rot) dargestellte deletierte Modul entsprach dabei in Wirklichkeit dem Bereich zwischen den T-Motiven des ersten und zweiten (TD-Typ) bzw. den His-Motiven des zweiten und dritten Moduls (CDM-Typ). Gleiches galt auch für das insertierte Modul Srf-M5 (grau). Im Hinblick auf die Darstellung der homologen Rekombination (Abb. 5.34) wurden Wildtyp-identische Genabschnitte innerhalb der Integrationsplasmide schraffiert, die Farben der einzelnen Module wurden dabei beibehalten. Alle für die Klonierung relevanten, mittels PCR generierten Restriktionsschnittstellen wurden eingezeichnet.

Dabei erschien es ratsam, die Insertabschnitte zu kürzen, um die möglichen Rekombinationsbereiche einzuschränken und damit die spätere Identifikation der Integrationsmutanten zu erleichtern. Alle für die Umklonierung erforderlichen DNA-Fragmente wurden mittels PCR gebildet, bei der mit Hilfe der Vorwärts-Primer $IP_{TD\ f}$ und $IP_{CDM\ f}$ jeweils eine *XbaI*-Restriktionsstelle bzw. der Rückwärts-Primer $IP_{TD\ r}$ und $IP_{CDM\ r}$ eine *KpnI*-Schnittstelle für die pMMN13-Ligation erzeugt wurde. Es entstanden die Deletionsplasmide pIP-*srfA-ΔLeu_{TD}* und pIP-*srfA-ΔLeu_{CDM}*, die ihrerseits die Grundlage für die Bildung der Austauschplasmide pIP-*srfA-Asp_{TD}* und pIP-*srfA-Asp_{CDM}* darstellten (Abb. 5.33). Dazu wurde zwischen die *AvrII*-Fusionsstellen, die die Module Srf-M1 und Srf-M3 verbanden, das jeweils korrespondierende Fragment des mittleren, L-Asparaginsäure-aktivierenden Moduls Srf-M5 inseriert (Abb. 5.33 und 5.34). Konkret umfaßten die Insertionen die Bereiche zwischen den T-Motiven des vierten und fünften Moduls (TD-Typ) bzw. zwischen den His-Motiven des fünften und sechsten Moduls (CDM-Typ; Abb. 5.34). Sie wurden beide mittels PCR amplifiziert und trugen sowohl am 5'- als auch am 3'-Ende eine künstlich erzeugte *AvrII*-Schnittstelle (Abb. 5.33). Jedoch erforderte die Verwendung von zwei identischen Restriktionsstellen für die Modul-Insertierung die Zwischenschaltung eines Dephosphorylierungsschrittes, der die Rückligation des geschnittenen Deletionsplasmids durch die Behandlung mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (CIP) verhinderte.

Insert	Fusionsstelle
Srf-M5 _{TD} (997-2042) zu Srf _{TD} -M1/2-3	
1.) M1	980-IAAIWQDVLNVEKAGIF <u>DNFFDLGGHSL</u> KAMTLLTKIHKETGI-1022
M4	974-LAEIWEGILGVKA-GVT <u>DNFFFMIGGHSL</u> KAMMMTAKIQEHFHK-1015
2.) M5	2019-LCRIWQKTLGIEAIGIDD <u>DNFFDLGGHSL</u> KGMMLIANIQAIELEK-2061
M2	2017-VADIWAQVLQAEQVGAY <u>DHFFDIGGHSL</u> LAGMKMPALVHQELGV-2059
	-T-
Srf-M5 _{CDM} (1193-2235) zu Srf _{CDM} -M1-2/3	
1.) M2	1171-GLEENRHMLLFDM <u>HHLLISDGVS</u> LGIMLEELARIYKGEQLPDLR-1213
M5	1169-QLEEKRHLLLDLM <u>HHLLITDGSS</u> TGILIGDLAKIYQGADLELPQ-1211
2.) M6	2212-RIEAKKHL LLLDM <u>HHLLIADGVS</u> LGIFVKELALLYKGEQLPEPT-2254
M3	2210-KHSDTERVLLFDM <u>HHLLISDGAS</u> VGVLIEELSKLYDGETLEPLR-2252
	-His-

Abb. 5.34: Fusionsstellen für die Insertion des L-Asparaginsäure-aktivierenden Moduls Srf-M5 zwischen die korrespondierenden Bereiche der bimodularen Vorläuferenzyme Srf_{TD}-M1/2-3 und Srf_{CDM}-M1-2/3. Jedes Insert besaß zwei Fusionsstellen, die jeweils in der Reihenfolge vom N- zum C-Terminus aufgeführt wurden. Dabei wurde die Sequenz der hybriden Enzyme durch entsprechende Unterstreichung der Aminosäuren (im Ein-Buchstaben-Code) hervorgehoben, die Aminosäurennumerierung erfolgte in Bezug auf das Wildtypenzym. Aminosäuren, die durch die Einführung der Restriktionsschnittstelle homolog substituiert wurden, wurden kursiv dargestellt. Die stark konservierten T- und His-Motive sind farbig markiert.

Nach der Überprüfung der Richtigkeit der jeweiligen Deletions- (pIP-*srfA-ΔLeu_{CDM}* und pIP-*srfA-ΔLeu_{TD}*) und Austauschplasmide (pIP-*srfA-Asp_{CDM}* und pIP-*srfA-Asp_{TD}*) durch eine Restriktionsanalyse (Abb. 5.35) wurden diese in den Wildtypstamm *B. subtilis* ATCC 21332

transformiert (Abb. 5.36). Die Transformation wurde mit Hilfe von *B. subtilis*-Protoplasten durchgeführt, bei der die Zellwände unmittelbar vor dem DNA-Transfer mit Lysozym durchlässig gemacht wurden. Anhand der erworbenen Chloramphenicolresistenzen konnten die gebildeten Integrationsmutanten leicht selektiert werden (Abb. 5.36).

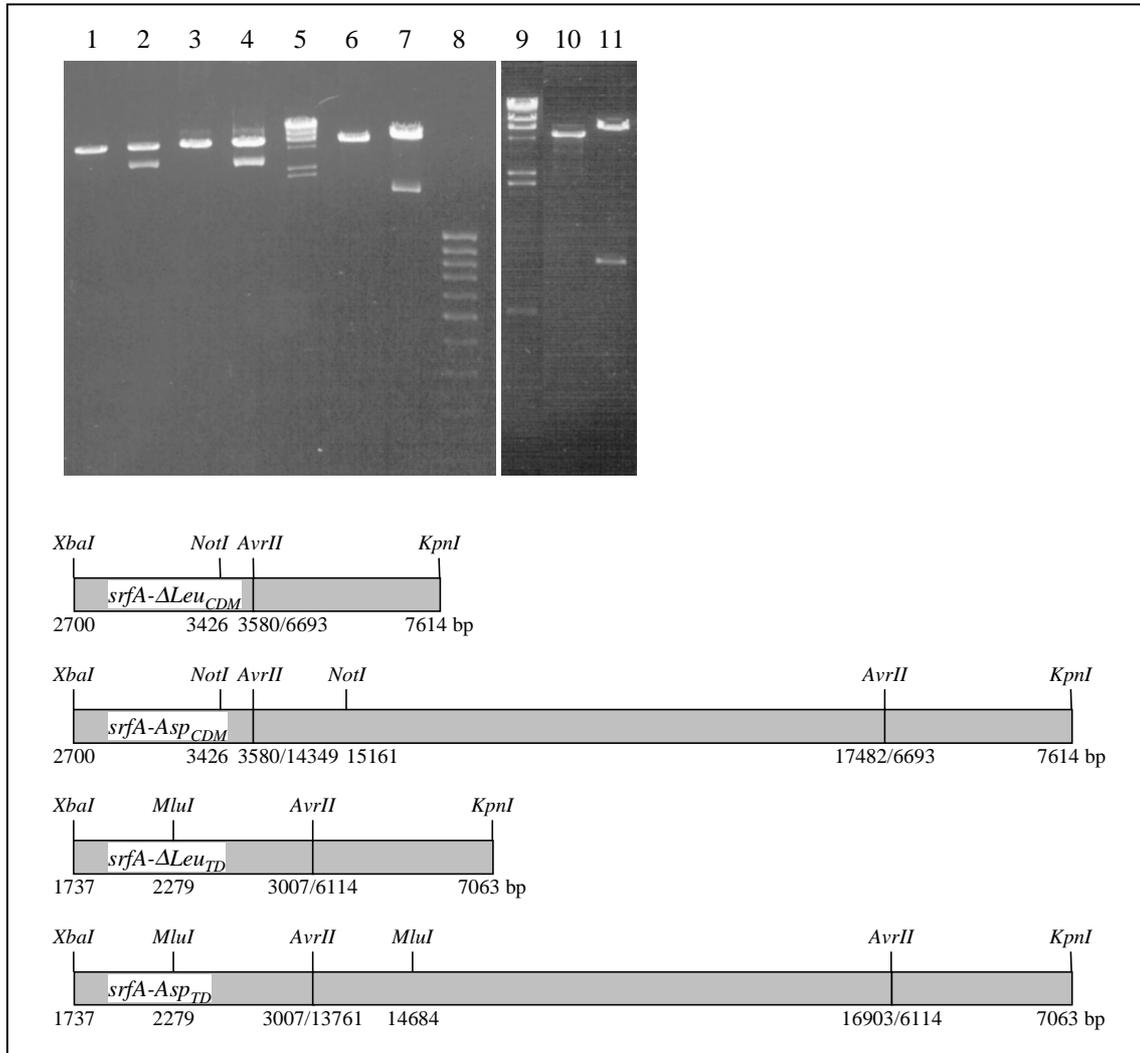


Abb. 5.35: Restriktionsanalyse der Deletions- und Austauschplasmide pIP-*srfA*- Δ Leu_{CDM}, pIP-*srfA*-Asp_{CDM}, pIP-*srfA*- Δ Leu_{TD} und pIP-*srfA*-Asp_{TD}. Die Spuren enthielten: 1-4, pIP-*srfA*- Δ Leu_{CDM} (6301 bp), pIP-*srfA*-Asp_{CDM} (3133 + 6301 bp), pIP-*srfA*- Δ Leu_{TD} (6719 bp) und pIP-*srfA*-Asp_{TD} (3142 + 6719 bp) jeweils *AvrII*; 5, λ -Marker *HindIII* (von oben nach unten: 23000, 9416, 6557, 4631, 2322, 2027, 564, 125 bp); 6-7, pIP-*srfA*- Δ Leu_{TD} (6719 bp) und pIP-*srfA*-Asp_{TD} (1651 + 8210 bp) jeweils *MluI*; 8, MBI-100bp-Marker; 9, λ -Marker *HindIII*; 10-11, pIP-*srfA*- Δ Leu_{CDM} (6301 bp) und pIP-*srfA*-Asp_{CDM} (966 + 8468 bp) jeweils *NotI*. Die Fragmentgrößen berechneten sich zuzüglich der pMMN13-Vektor-DNA von 4500 bp.

Bei der Transformation mit den Deletionsplasmiden ergaben sich jeweils zwei identische Teilbereiche mit dem Wildtypenzym, die nunmehr willkürlich miteinander rekombinieren konnten (Abb. 5.36a).

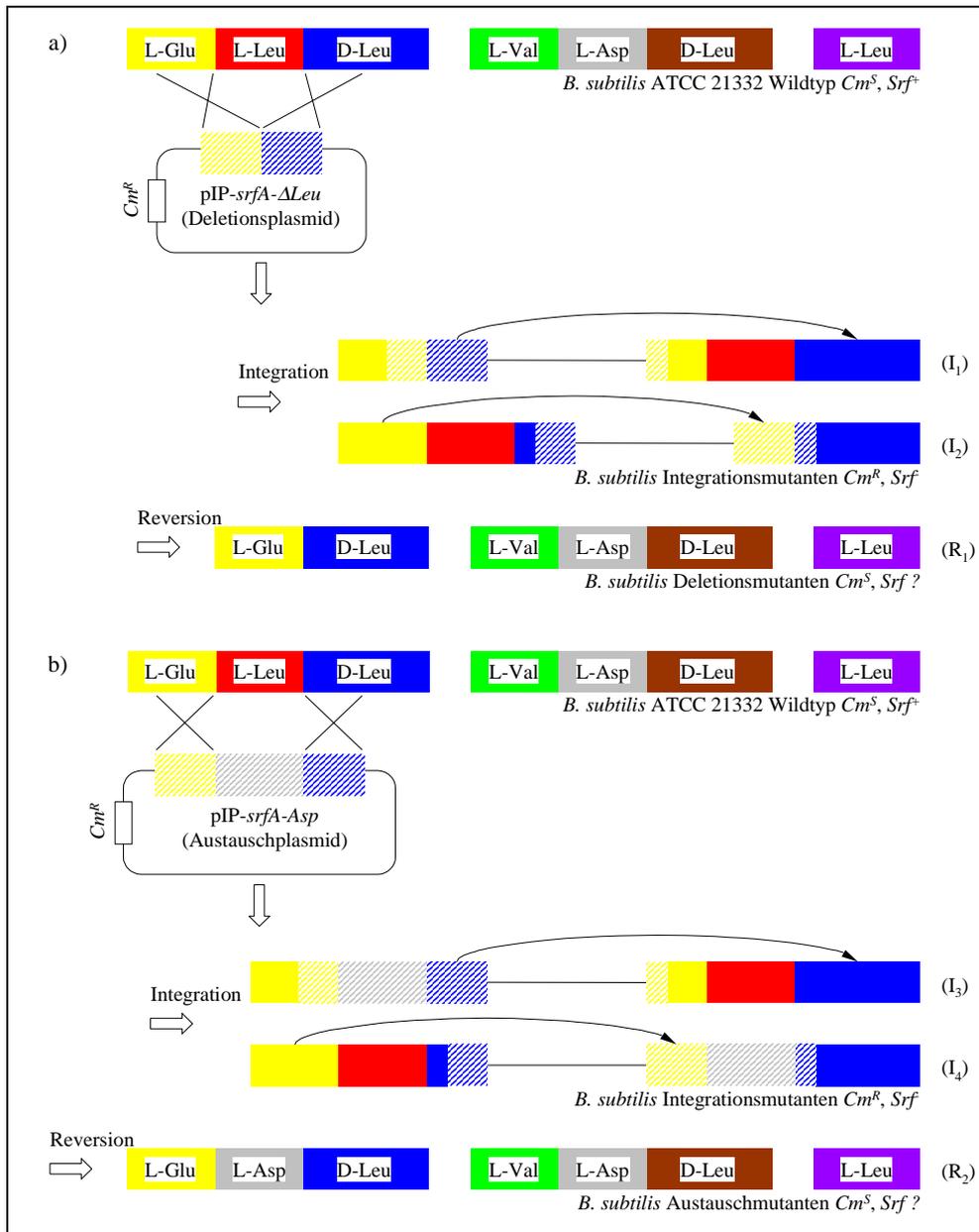


Abb. 5.36: Konstruktion der *B. subtilis* Deletions- (a) und Austauschmutanten (b) über jeweils zwei homologe Rekombinationsstufen (Integration und Reversion). In Abhängigkeit vom rekombinierten Bereich entstanden bei der Integration mehrere Typen von Integrationsmutanten: I_1 und I_3 bei der Rekombination in Srf-M1 bzw. I_2 und I_4 bei der Rekombination in Srf-M3. Die Chloramphenicolresistenz (Cm^R) der Plasmide wurde infolge des kompletten Einbaus einschließlich des pMMN13-Vektors in das *B. subtilis*-Chromosom auf die Integrationsmutanten übertragen, jedoch war die Surfactin-Synthese durch die Unterbrechung des Leserasters gestört. Bei erneuter Rekombination im gleichen Modul wurde einerseits der Wildtyp wiederhergestellt, andererseits führte die Reversion im jeweils anderen Modul zur Umstrukturierung der Surfactin-Synthetase, die Reversionstypen wurden mit R_1 für die Deletionsmutanten und mit R_2 für die Austauschmutanten bezeichnet. Als Selektionsmarker wurde der Verlust der Cm^R benutzt. Im Fall der Transformationen mit den Austauschplasmiden existierte neben den dargestellten Rekombinationsmöglichkeiten in Srf-M1 und Srf-M3 als dritte Variante die Rekombination in Srf-M5. Für die beabsichtigte Umprogrammierung der Surfactin-Synthetase hatte dies jedoch keinen praktischen Nutzen, so daß auf eine ausführliche Beschreibung verzichtet wurde.

Durch Rekombination im Modul Srf-M1 entstanden so Integrationsmutanten vom Typ I_1 während die Rekombination im Modul Srf-M3 zu Integrationsmutanten vom Typ I_2 führte. Im Gegensatz dazu konnten bei der Verwendung der Austauschplasmide drei identische DNA-

Bereiche (Srf-M1, Srf-M3 und Srf-M5) miteinander rekombinieren, wovon aber nur Rekombinationen in Srf-M1 und Srf-M3 praktische Bedeutung für die gezielte Umprogrammierung der Surfactin-Synthetase besaßen. Auf weitere Darstellungen der Rekombination in Srf-M5 wurde daher verzichtet. Aus den Rekombinationen in Srf-M1 und Srf-M3 ergaben sich in Analogie zu I_1 und I_2 die Integrationstypen I_3 bzw. I_4 (Abb. 5.36b). In der weiteren Beschreibung erfolgte die Bezeichnung der Mutanten nach folgendem Schlüssel: die Anfangsbuchstaben I und R stehen jeweils für Integration bzw. Reversion, die Zahlen für die modulare Zusammensetzung der genetisch veränderten Surfactin-Synthetase SrfA-A und die Indizes für die Fusionsstelle.

Zur Identifizierung der vier gewünschten Integrationsmutanten wurden nach der Isolierung chromosomaler DNA Genfragmente mittels PCR amplifiziert, bei denen einerseits der Vorwärts-Primer $T7_f$ an die T7-Promotorsequenz des pMMN13-Vektors anheftete, während für die Rückwärts-Primer (Ins 2_r und Ins 3_r ; Tab. 3.5) Nukleotidsequenzen aus den Modulen Srf-M2 bzw. Srf-M3 gewählt wurden (Abb. 5.37). Es wurde festgestellt, daß mit Ausnahme von $I13_{CDM}$ alle untersuchten Konstrukte im Modul Srf-M3 rekombiniert wurden (Abb. 5.36 und 5.37). Aufgrund der Übereinstimmung mit den erwarteten Fragmentgrößen von 945, 4082, 1918 bzw. 5060 bp für die Integrationsmutanten $I13_{CDM}$, $I153_{CDM}$, $I13_{TD}$ und $I153_{TD}$ ergaben sich dadurch erste Hinweise auf die Richtigkeit der Integration (Abb. 5.37). Eine endgültige Bestätigung der positivverdächtigen Kandidaten wurde durch eine Restriktionsanalyse der PCR-Produkte erbracht (Abb. 5.37).

Nach der Bestätigung der korrekten Integration der vier verschiedenen Plasmide wurde der zweite Rekombinationsschritt durch wiederholtes Passagieren in chloramphenicolfreies LB-Medium bei 37 °C ausgelöst. Dieser Prozeß war äußerst zeitaufwendig, da zwischen 24 und 62 Passagen benötigt wurden, um jeweils einen positiven Klon zu isolieren. Die erfolgreiche Reversion wurde schließlich durch den Verlust der Chloramphenicolresistenz (Cm^S) angezeigt (Abb. 5.36), allerdings lag die Effizienz dieses Prozesses unter 1 %.

Da infolge der Integration die Anzahl identischer Sequenzbereiche nicht verändert wurde, besaßen auch die Integrationsmutanten entsprechend ihres Ursprungs zwei (Deletionsplasmide) bzw. drei (Austauschplasmide) Rekombinationsmöglichkeiten, von denen jeweils aber nur eine zur Bildung der korrekten Reversionsmutanten führte (Abb. 5.36). Im Falle des während der ersten Stufe im Modul Srf-M1 rekombinierten $I13_{CDM}$ war dies die Rekombination in Srf-M3, während umgekehrt für die in Srf-M3 rekombinierten übrigen Integrationsmutanten $I13_{TD}$, $I153_{TD}$ und $I153_{CDM}$ nur die Rekombination in Srf-M1 Erfolg hatte.

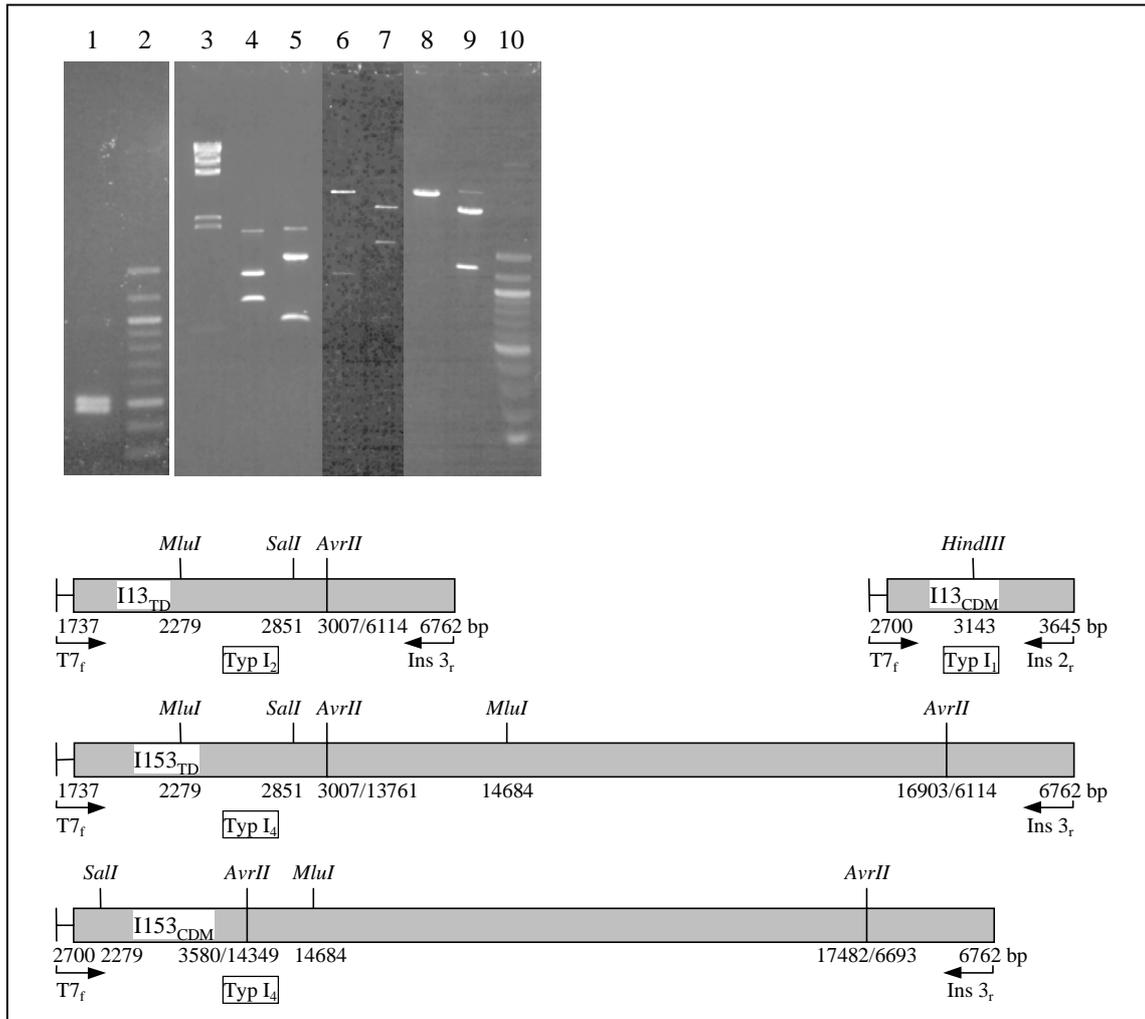


Abb. 5.37: Restriktionsanalyse der aus den Integrationsmutanten I13_{CDM}, I13_{TD}, I153_{TD} und I153_{CDM} gewonnenen PCR-Fragmente mit Größen von 1918, 945, 5060 bzw. 4082 bp (Berechnung unter Vernachlässigung des Vektorbeitrages). Unter der Restriktionsanalyse sind die entsprechenden PCR-Produkte aller Mutanten einschließlich ihrer Zuordnung zu den Integrationstypen gemäß Abbildung 5.36 sowie die verwendeten Primer und relevanten Restriktionsschnittstellen dargestellt. Die Spuren enthielten: 1, I13_{CDM} *HindIII* (443 + 502 bp); 2, NEB-100bp-Marker; 3, λ -Marker *HindIII* (von oben nach unten: 23000, 9416, 6557, 4631, 2322, 2027, 564, 125 bp); 4, I13_{TD} *Sall* (804 + 1114 bp); 5, I13_{TD} *MluI* (542 + 1376 bp); 6, I153_{TD} *Sall* (1114 + 3946 bp); 7, I153_{TD} *MluI* (542 + 1651 + 2867 bp); 8, I153_{CDM} *Sall* (151 + 3931 bp); 9, I153_{CDM} *MluI* (1215 + 2867 bp); 10, NEB-100bp-Marker.

Wie zuvor die Integrationsmutanten wurden auch die Reversionsmutanten R13_{CDM}, R153_{CDM}, R13_{TD} und R153_{TD} mit Hilfe einer kombinierten PCR-/Restriktionsanalyse nachgewiesen (Abb. 5.38). Dafür wurden als PCR-Primer die Oligonukleotide Rev 1_f, Rev 3_r und Rev 5_r verwendet, die ihren Ursprung in den Nukleotidsequenzen der Module Srf-M1, Srf-M3 und Srf-M5 besaßen. Aus den Größen der resultierenden DNA-Fragmente von 1504 (R13_{CDM}), 1495 (R153_{CDM}) und 1510 bp (R13_{TD} und R153_{TD}) ergaben sich dabei bereits deutliche Hinweise auf die korrekten Reversionen (Abb. 5.38).

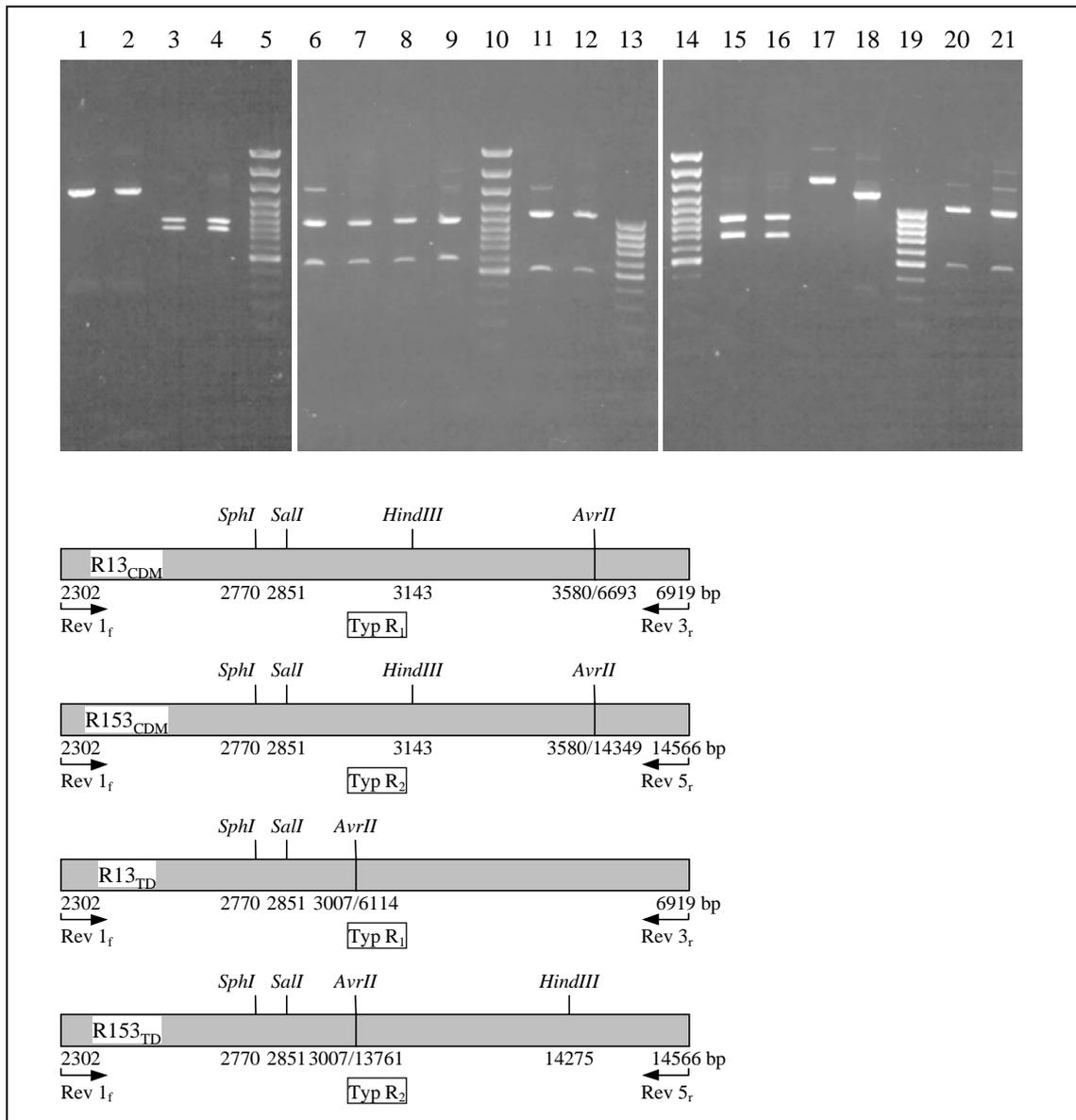


Abb. 5.38: Restriktionsanalyse der aus den Reversionsmutanten R13_{CDM}, R153_{CDM}, R13_{TD} und R153_{TD} gewonnenen PCR-Fragmente mit Größen von 1504, 1495, 1510 und 1510 bp. Unter der Restriktionsanalyse sind die PCR-Produkte der jeweiligen Deletions- und Austauschmutanten einschließlich der Reversionstypen gemäß Abbildung 5.36 sowie die verwendeten Primer und relevanten Restriktionsschnittstellen dargestellt. Die Spuren enthielten: 1-4, R13_{CDM} (226 + 1278 bp), R153_{CDM} (217 + 1278 bp), R13_{TD} (705 + 805 bp) und R153_{TD} (705 + 805 bp) jeweils *AvrII*; 5, MBI-100bp-Plus-Marker; 6-9, R13_{CDM} (549 + 955 bp), R153_{CDM} (549 + 946 bp), R13_{TD} (549 + 961 bp) und R153_{TD} (549 + 961 bp) jeweils *SalI*; 10, MBI-100bp-Plus-Marker; 11-12, R13_{CDM} (468 + 1036 bp) und R153_{CDM} (468 + 1027 bp) jeweils *SphI*; 13, MBI-100bp-Marker; 14, MBI-100bp-Plus-Marker; 15-18, R13_{CDM} (663 + 841 bp), R153_{CDM} (654 + 841 bp), R13_{TD} (1510 bp) und R153_{TD} (291 + 1219 bp) jeweils *HindIII*; 19, MBI-100bp-Marker; 20-21, R13_{TD} (468 + 1042 bp) und R153_{TD} (468 + 1042 bp) jeweils *SphI*.

Durch die erfolgreiche *in vivo*-Rekombination der manipulierten *srfA*-Gene in das *B. subtilis*-Chromosom standen für die biochemische Charakterisierung die nachfolgend abgebildeten vier Reversionsmutanten *B.s.* R13_{TD}, *B.s.* R153_{TD}, *B.s.* R13_{CDM} und *B.s.* R153_{CDM} zur Verfügung (Abb. 5.39).

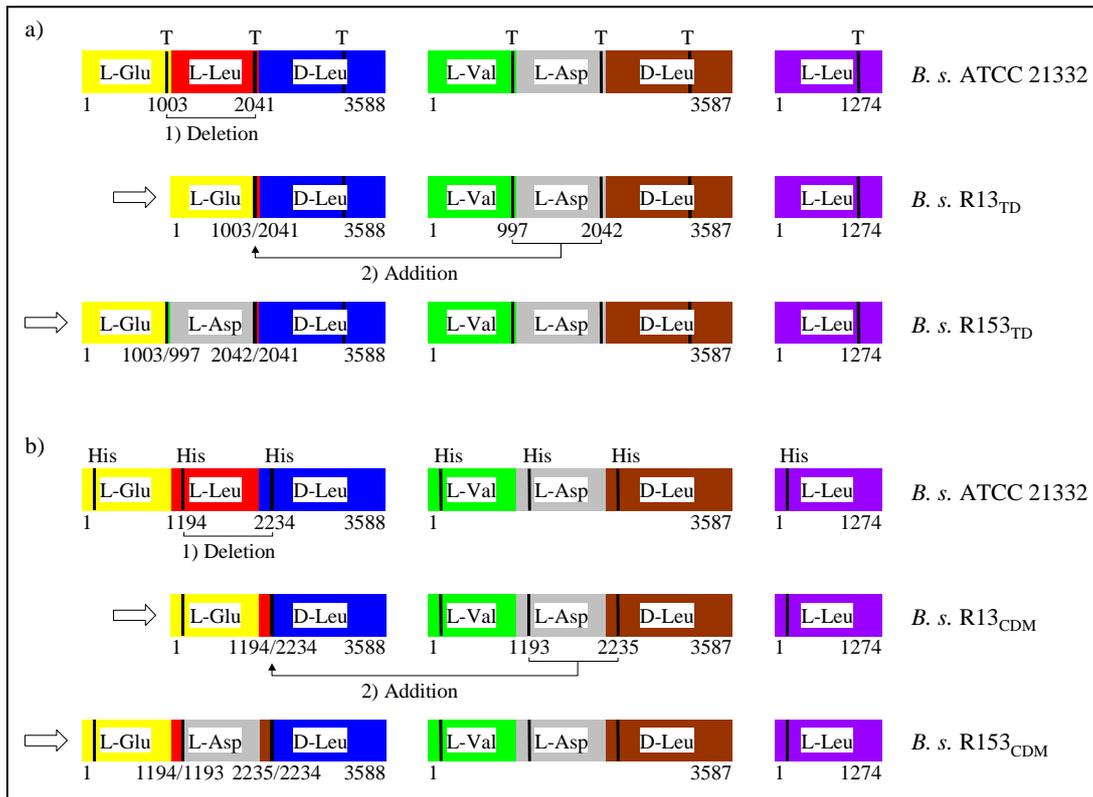


Abb. 5.39: Modulare Organisation der modifizierten Surfactin-Synthetasen infolge der Rekombination innerhalb des T-Motivs (TD-Typ, a) bzw. innerhalb des His-Motivs (CDM-Typ, b). Anders als bei den vereinfachten Darstellungen in Abbildung 5.33 und 5.36 wurden hier die tatsächlich deletierten und insertierten Bereiche wiedergegeben. Unter den verschiedenfarbig kodierten Modulen ist die Aminosäurenumerierung im Verhältnis zum Wildtypenzym angegeben, die betreffende Veränderung zum vorhergehenden Enzym wurde hervorgehoben. Die Abgrenzung der Module untereinander erfolgte nach dem derzeitigen Kenntnisstand jeweils in der Linkerregion zwischen der T- und der darauffolgenden C-Domäne. Sämtliche T- (a) bzw. His-Motive (b) einschließlich der chimären Abschnitte wurden als schwarze Balken dargestellt.

5. 4. 2 Phänotypische und enzymatische Charakterisierung der rekombinanten Surfactin-Synthetase-Systeme

Die Unterschiede zwischen den Revertanten untereinander als auch gegenüber dem Wildtyp *B. subtilis* ATCC 21332 äußerten sich bereits in deren Koloniebild (Abb. 5.40). Während die Wildtypkolonien auf LB-Agarplatten trocken und teilweise faltig erschienen, war die Oberfläche der drei Mutanten *B. subtilis* R13_{TD}, R153_{TD} und R153_{CDM} glatt und feucht, die Beschaffenheit des vierten Konstruktes R13_{CDM} lag dazwischen. Darüber hinaus setzten bei R13_{TD}, R153_{TD} und R153_{CDM} bereits frühzeitig starke Autolyseprozesse ein, die in diesem Umfang weder beim Wildtyp noch bei R13_{CDM} festgestellt wurden. Nach 10 bis 12tägiger Nachinkubation bei Raumtemperatur hatten sich diese Kolonien fast vollständig aufgelöst.

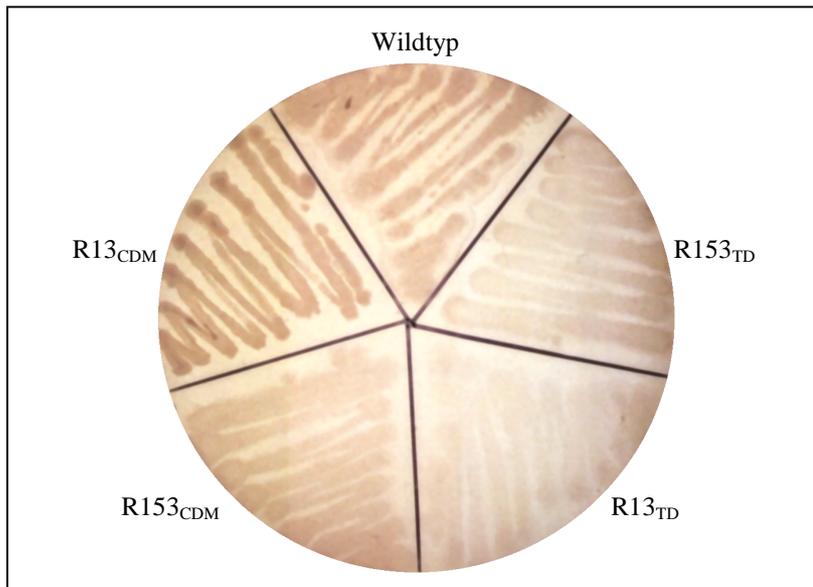


Abb. 5.40: Vergleich des Erscheinungsbildes von *B. subtilis* ATCC 21332 und den Revertanten R13_{CDM}, R153_{CDM}, R13_{TD} und R153_{TD} auf LB-Agar.

Auch bei der Kultivierung in flüssigem Nährmedium setzten sich die Differenzen zwischen den Revertanten fort. Unabhängig vom Medium (Landy- oder LB-) stiegen die Zelldichten der glatten Revertanten trotz identischer Bedingungen (Temperatur, Inokulation, Schüttelfrequenz) wesentlich langsamer im Vergleich zum Wildtyp bzw. zur R13_{CDM}-Mutante und erreichten im Maximum nur etwa 60 bis 65 % der Wildtypergebnisse. Dagegen konnten für die Mutante R13_{CDM} keine Unterschiede zum Wildtypwachstum festgestellt werden (Abb. 5.41).

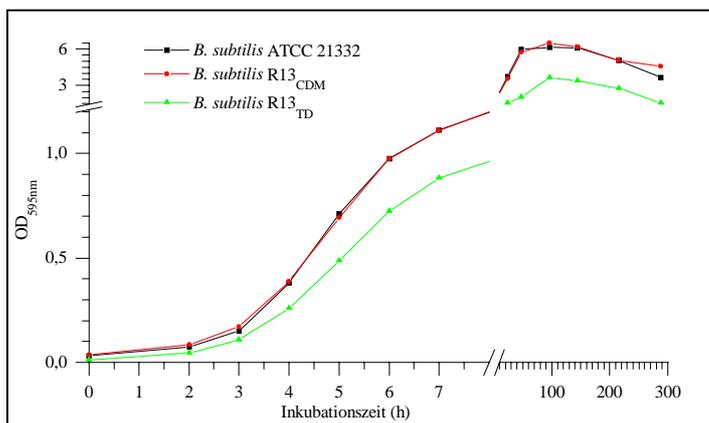


Abb. 5.41: Wachstum von *B. subtilis* ATCC 21332, R13_{CDM} und R13_{TD} in Landy-Medium bei 28 °C. Die Fermentationen wurden jeweils mit frischen Landy-Übernachtskulturen im Verhältnis 1:100 gestartet. Alle Werte wurden aus mindestens drei Einzelmessungen gewonnen.

Bei der Überprüfung der Proteinexpression zeigte sich, daß in Einklang mit deren verschlechtertem Zellwachstum die drei Reversionsmutanten R13_{TD}, R153_{TD} und R153_{CDM} auch nicht in der Lage waren, die Surfactin-Synthetase-Untereinheiten zu synthetisieren (Abb. 5.42). Dabei fehlte nicht nur die hybride Surfactin-Synthetase SrfA-A, auch die beiden

anderen Untereinheiten SrfA-B und SrfA-C konnten trotz umfangreicher Optimierungsversuche (Medium, Temperatur, Belüftung, Schüttelfrequenz) zu keinem Zeitpunkt nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu zeigte das vierte Konstrukt R13_{CDM} auch bei der Proteinexpression große Parallelen zum Wildtyp. Wie bei diesem begann die Surfactin-Produktion in der späten exponentiellen Wachstumsphase (etwa 1 d) und setzte sich während des stationären Wachstums fort (3 bis 4 d). Abbildung 5.42 zeigt, daß neben den unveränderten Surfactin-Synthetase-Untereinheiten SrfA-B (401 kDa) und SrfA-C (140 kDa) auch die hybride Synthetase SrfA- Δ Leu (280 kDa) gebildet wurde. Beim Wildtyp wurden neben der hochmolekularen Doppelbande bei 402/401 kDa (SrfA-A und SrfA-B) auch kleinere Abbauprodukte beobachtet. Derartige Effekte wurden auch schon von Menkhaus et al. beschrieben (1993).

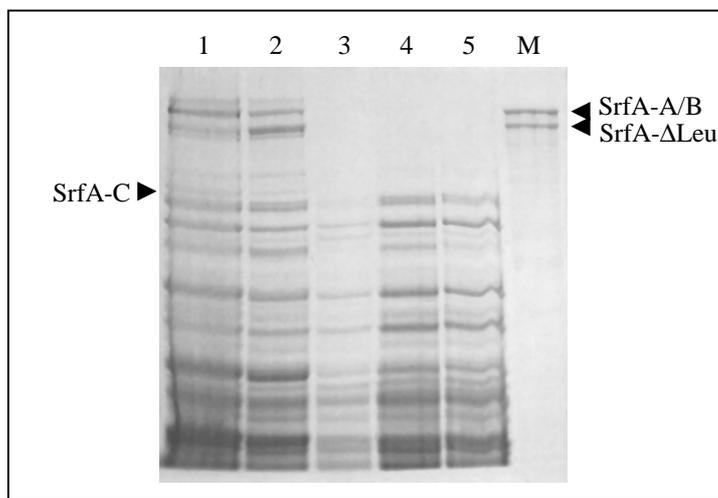


Abb. 5.42: Vergleich der Proteinexpression zwischen den *B. subtilis*-Revertanten R13_{CDM}, R13_{TD}, R153_{CDM} und R153_{TD} und dem Wildtyp ATCC 21332. Die Kultivation der Bakterienzellen erfolgte bei 28 °C in Landy-Medium, alle Proben wurden in der stationären Wachstumsphase entnommen. Nach 3 h Zellaufschluß mit einer 0,5 % Lysozym-Lösung (in TE-Puffer) bei Raumtemperatur wurden die Proben auf ein 7,5 %iges SDS-Gel aufgetragen. Die Spuren enthielten: 1, ATCC 21332; 2, R13_{CDM}; 3, R13_{TD}; 4, R153_{CDM}; 5, R153_{TD}. Für den Größenvergleich (M) wurde ein Gemisch aus heterolog exprimiertem, gereinigtem SrfA-A (402 kDa) und Srf_{ADH}-M1/2-3 (280 kDa) aufgetragen.

Wegen der zu erwartenden Beeinträchtigung aller proteinabhängigen Funktionen bei R13_{TD}, R153_{TD} und R153_{CDM} konzentrierten sich die nachfolgenden Untersuchungen insbesondere auf die vierte Mutante R13_{CDM}. Einen ersten Hinweis auf die Funktionsfähigkeit der hybriden Surfactin-Synthetase SrfA- Δ Leu im Verband mit den anderen beiden Untereinheiten SrfA-B und SrfA-C sollte die Messung des ATP-PP_i-Austauschs geben. Dazu wurden die Enzyme aus *B. subtilis* ATCC 21332 und R13_{CDM} nach einem kombinierten Lysozym-/French[®] Press-Zellaufschluß mittels Ammoniumsulfatfällung und Gelfiltration an Ultrogel[®] AcA 34 grob aufgereinigt und jeweils in einen „hoch-“ (Hauptfraktion um 400 kDa) und einen „niedermolekularen“ (Hauptfraktion um 280 kDa) Pool getrennt (Abb. 5.43).

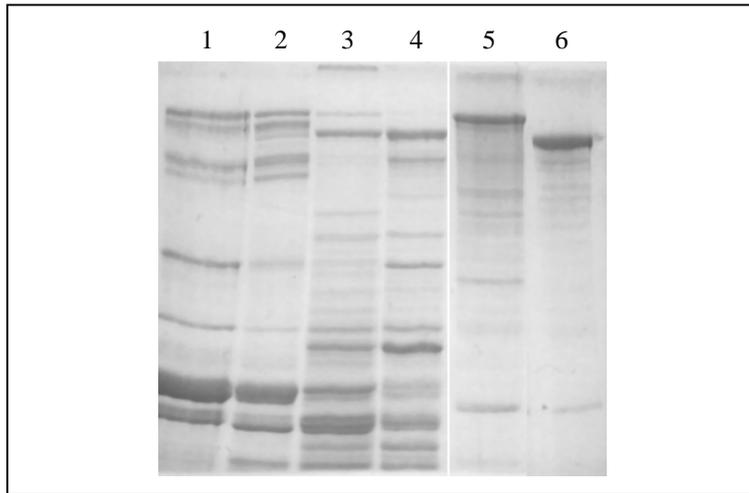


Abb. 5.43: SDS-Page der gereinigten Enzympräparationen aus *B. subtilis* ATCC 21332 und R13_{CDM}. Es wurden jeweils 30 µg Protein auf ein 7,5 %iges SDS-Gel aufgetragen. Die Spuren enthielten: 1-2, *B.s.* ATCC 21332 Pool 1 und 2; 3-4, *B.s.* R13_{CDM} Pool 1 und 2. Für den Größenvergleich wurden je 10 µg gereinigtes SrfA-A (Spur 5; 402 kDa) und Srf_{ADH}-M1/2-3 (Spur 6; 280 kDa) herangezogen.

Die Bestimmung des ATP-PP_i-Austauschs erfolgte mit sämtlichen Surfactin-relevanten L-Aminosäuren, in Tabelle 5.9 sind die spezifischen Aktivitäten der Enzymfraktionen zusammengefaßt.

Tab. 5.9: Spezifische Aktivitäten der gereinigten *B.s.*-Proteine im ATP-PP_i-Austausch (in cpm/h × µg).

	<i>B.s.</i> ATCC 21332		<i>B.s.</i> R13 _{CDM}	
	Pool 1	Pool 2	Pool 1	Pool 2
L-Glutaminsäure	1080 ± 40	610 ± 190	1800 ± 200	3100 ± 200
L-Leucin	11000 ± 600	3900 ± 400	3900 ± 200	4000 ± 100
L-Valin	5500 ± 100	3000 ± 200	3300 ± 200	2800 ± 200
L-Asparaginsäure	2800 ± 400	2200 ± 100	1200 ± 200	870 ± 140

Jeder Wert wurde aus zwei Einzelmessungen im linearen Reaktionsbereich ermittelt.

Erwartungsgemäß wurden für den Wildtyp die höchsten Aktivitäten mit den vier untersuchten Aminosäuren im Pool 1 gemessen, da dieser die beiden trimodularen Synthetasen SrfA-A und SrfA-B vereinte. Wie die relativ einheitliche Abnahme der Adenylierungsaktivitäten aller vier Aminosäuren zeigte, waren diese beiden Enzyme auch in Pool 2 enthalten. Angesichts der drei Leucin-aktivierenden Module (Srf-M2, -M3 und -M6) überraschte es nicht, daß die höchsten Aktivitäten mit L-Leucin detektiert wurden. Darüber hinaus bestätigte sich bei der Untersuchung des *B. subtilis*-Proteins erneut die schwächere Adenylierungsaktivität des L-Glutaminsäure-Aktivierungsmoduls gegenüber den übrigen Modulen. Auch für die Mutante R13_{CDM} wurden mit allen Aminosäuren Enzymaktivitäten detektiert, die in ihrer Größenordnung dem Wildtypenzym entsprachen. Durch die Verteilung der beiden Synthetasen SrfA-B und SrfA-ΔLeu auf die beiden Fraktionen wurde eine Teilung der Enzymaktivitäten erwartet, bei der Pool 1 die Aminosäuren Valin, Asparaginsäure und Leucin und Pool 2 die Aminosäuren Glutaminsäure und Leucin aktivieren sollte. Obwohl in beiden Fraktionen reinigungsbedingt (Abb. 5.43) auch mit den Substrataminosäuren der jeweils anderen

Synthetase erhebliche Enzymaktivitäten nachgewiesen wurden, ließ sich neben dem Splitting der Adenylierungsfunktionen ebenfalls der deletionsbedingte Rückgang der L-Leucin-Aktivierung gegenüber dem Wildtypenzym identifizieren.

Zur Bestimmung der Konsequenzen aus der Manipulation der Surfactin-Synthetase auf die *in vivo*-Lipopeptidsynthese wurde die Surfactin-Produktion des revertanten *B. subtilis*-Stammes R13_{CDM} untersucht und mit dem Wildtyp verglichen. Der erste Schritt beinhaltete die dünnschichtchromatographische Analyse, bei dem das Surfactin nach 3tägiger Fermentation in Landy-Medium mit Salzsäure bis pH 2,0 gefällt und anschließend mit Methanol extrahiert wurde. Nach Besprühen der Kieselgel-DC-Platte mit Wasser und leichter Erwärmung erschienen die Surfactin-Spots als weiße Flecken vor einem blaßgrauen Hintergrund (Abb. 5.44). Für den Wildtyp genügten bereits geringe Mengen des Methanolextraktes zum Nachweis der Surfactin-Synthese. Der R_f -Wert des Wildtyppeptids betrug durchschnittlich 0,51 und zeigte damit eine gute Übereinstimmung zu früheren Literaturangaben (Ullrich et al., 1991; Menkhaus et al., 1993).

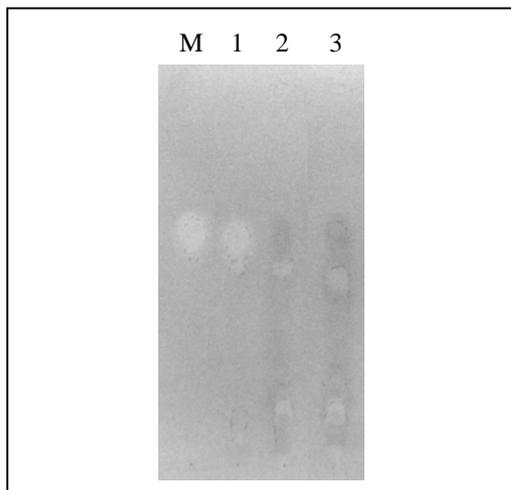


Abb. 5.44: Dünnschichtchromatographische Analyse der Surfactin-Synthese. Aus je 100 ml Landy-Kultur wurden die Surfactine entsprechend der Vorschrift mit 10 ml Methanol extrahiert, die Trennung erfolgte auf einer Kieselgel-DC-Platte in dem Fließmittel 4. Zur Detektion der Surfactin-Spots wurde die getrocknete Platte mit Wasser angesprüht und leicht erwärmt. Die Spuren enthielten identisch aufgearbeitete Methanolextrakte von: 1, *B.s.* ATCC 21332 (5 µl); 2-3, *B.s.* R13_{CDM} (50 bzw. 100 µl). Für den Vergleich wurden 5 µl einer 5 mg/ml Surfactin-Lösung aufgetragen (Spur M).

Im Falle des R13_{CDM}-Extraktes wurde statt dessen ein Spot mit einem R_f -Wert von 0,39 detektiert, der massenspektrometrisch eindeutig als Lipohexapeptid und damit als neues Surfactin-Produkt identifiziert werden konnte. Allerdings mußte dafür mindestens die zehnfache Menge des Extraktes aufgetragen werden. Unter Berücksichtigung der Produktintensitäten resultierte daraus eine Peptidausbeute von weniger als 5 % gegenüber dem Wildtypproduzenten, dessen Ausbeute wurde anhand eines Vergleichs mit einer Surfactin-Lösung bekannter Konzentration auf etwa 500 mg je 1 Liter Landy-Medium geschätzt. Ergänzt wurden diese Untersuchungen durch die Überprüfung der übrigen Revertanten R13_{TD}, R153_{TD} und R153_{CDM}, die nicht unerwartet negativ ausfielen.

Mit Hilfe MALDI-massenspektrometrischer Analysen wurde der endgültige Nachweis erbracht, daß es sich bei dem neuen Peptidprodukt von *B. subtilis* R13_{CDM} tatsächlich um das gesuchte Surfactinderivat handelte (Abb. 5.45). Für die Messungen wurden auch hier die Methanolextrakte verwendet, da parallele Untersuchungen an intakten Revertanzellen aufgrund der eingeschränkten Produktausbeute scheiterten.

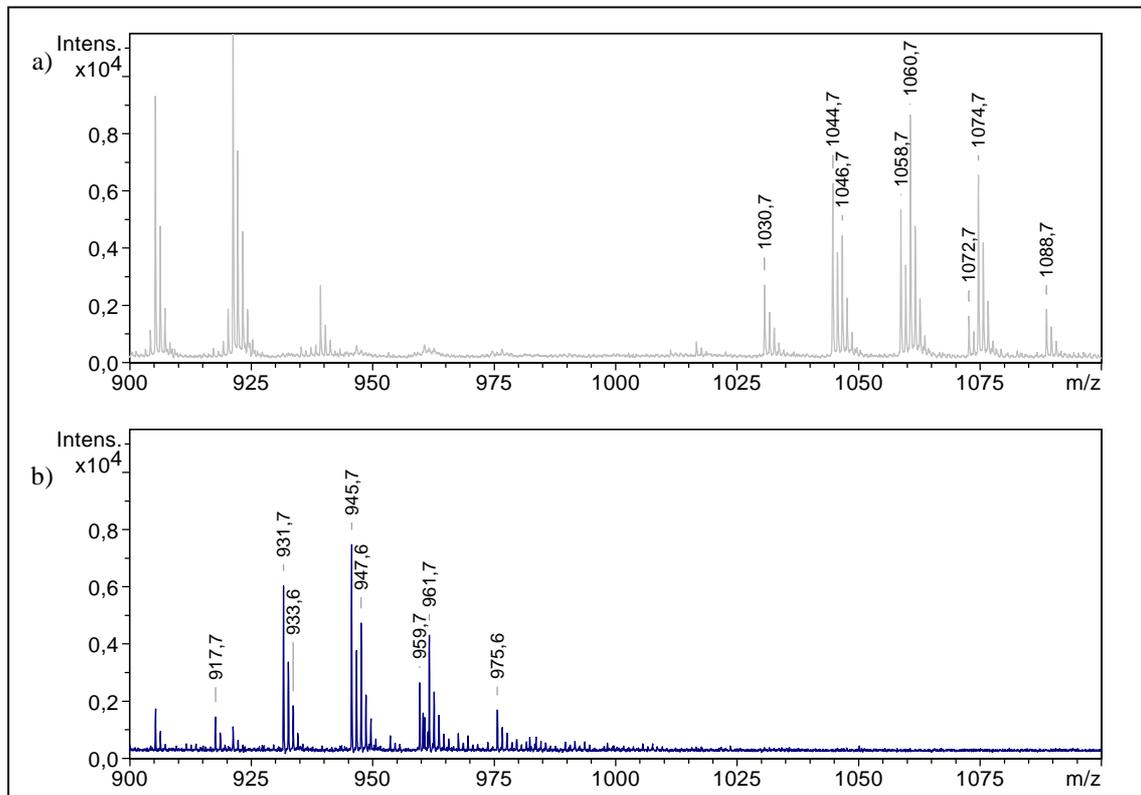


Abb. 5.45: MALDI-Massenspektren der Surfactinprodukte von *B. subtilis* ATCC 21332 (a) und *B. subtilis* R13_{CDM} (b) im Bereich m/z 900 bis 1100. Für beide Surfactintypen wurde die typische Signalclustering hervorgehoben, die sich infolge der unterschiedlichen Fettsäurekettenlängen ergab. Die m/z -Werte (1030,7; 1044,7; 1058,7; 1072,7) und (1046,7; 1060,7; 1074,7; 1088,7) entsprachen den Na⁺- bzw. K⁺-Addukten mit C13- bis C16-Fettsäurekörpern des Wildtyps (a), die m/z -Werte (917,7; 931,7; 945,7; 959,7) und (933,7; 947,7; 961,7; 975,7) den korrespondierenden Na⁺- bzw. K⁺-Addukten der Revertante R13_{CDM} (b). Darüber hinaus wurden insbesondere beim Wildtyp Signale um m/z 905,3 921,3 und 939,3 beobachtet, die jedoch nicht näher charakterisiert wurden, da bereits die m/z -Differenz zu dem Lipopeptid Surfactin keiner der vier Substrataminosäuren (Glu, 129,1; Leu, 113,2; Val, 99,1; Asp, 115,1) entsprach und somit eine Zuordnung als Hexapeptid ausgeschlossen werden konnte. Die Neuartigkeit des R13_{CDM}-Peptids war damit eindeutig nachgewiesen.

Die Massenspektren sowohl des Wildtyp-Surfactins als auch des R13_{CDM}-Peptids wiesen die für alle Lipopeptide typische Signalclustering auf (Abb. 5.45), die ihren Ursprung in der variierenden Kettenlänge der Fettsäuregruppe hatten. Infolge der Kultivationsbedingungen wurden beide Spektren vor allem durch die Na⁺- und K⁺-Addukte dominiert, die Kettenlängen der β -Hydroxyfettsäuren betragen zwischen 13 und 16 C-Atomen. Deutliche Unterschiede zwischen beiden Peptiden wurde dagegen bei der Lage der Signalcluster festgestellt. Während die Wildtyp-Peaks (m/z 1031 bis 1089) durchweg eine gute Übereinstimmung mit den an ganzen *B. subtilis*-Zellen gemessenen Ergebnissen (Leenders et al., 1999) zeigten, wurden

statt dessen für die Reversionsmutante R13_{CDM} erstmals Signale in dem Bereich zwischen m/z 918 und 976 gemessen (Abb. 5.45). Die für den Wildtyp charakteristischen Signale fehlten dagegen völlig. Mit einer m/z -Differenz von 113 entsprach die Verschiebung gegenüber dem nativen Surfactin-Cluster exakt dem deletierten Leucin-Rest, so daß die R13_{CDM}-Signale eindeutig dem gesuchten Lipohexapeptid, einem Surfactinderivat mit nur sechs Aminosäuren, zugeordnet werden konnten. Sämtliche experimentell ermittelten Daten stimmten mit einer maximalen Fehlergrenze von 0,1 % mit den errechneten Werten überein.

Weiterführend bestätigte eine „Post-Source Decay“ (PSD)-massenspektrometrische Analyse am Beispiel des m/z -Signals bei 931,7 aus dem R13_{CDM}-Surfactin die Richtigkeit der Peak-Zuordnung (Abb. 5.46). In dem PSD-Spektrum konnten alle Fragment-Ionen nachgewiesen werden, die sich aus der stufenweisen Abspaltung der sechs Substrat-aminosäuren von dem Eltern-Ion ergaben.

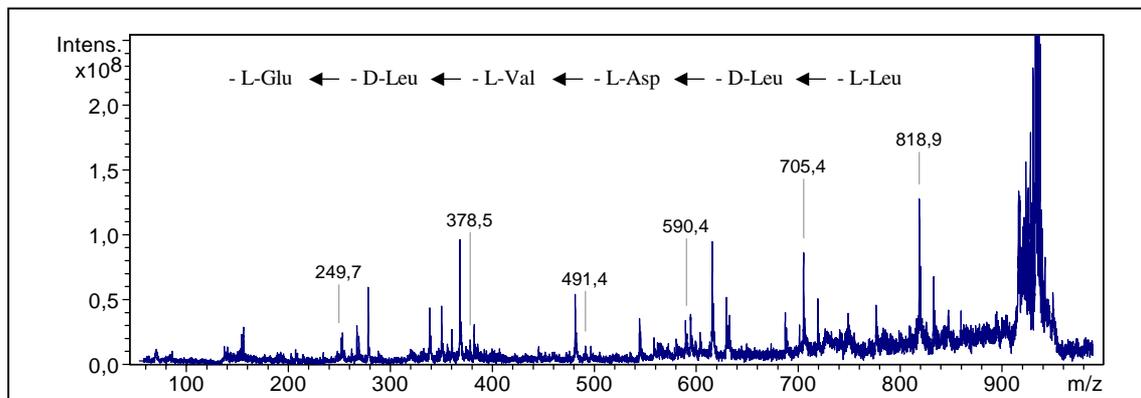


Abb. 5.46: MALDI-PSD-massenspektrometrische Analyse des Surfactinanalogs von *B. subtilis* R13_{CDM}. Das fragmentierte Eltern-Ion bei m/z bei 931,7 entspricht dem Na⁺-Addukt des Peptidprodukts mit einer C14- β -Hydroxyfettsäure. Die hervorgehobenen Fragmente entstanden durch stufenweise Abspaltung der Aminosäurereste L-Leucin, D-Leucin, L-Asparaginsäure, L-Valin, D-Leucin und L-Glutaminsäure.

Obwohl für die drei übrigen Revertanten R153_{CDM}, R13_{TD} und R153_{TD} mittels SDS-Page keine Synthetase-Produktion nachzuweisen war, wurden auch diese Konstrukte MALDI-massenspektrometrisch auf ihre Biosynthese untersucht. Jedoch konnte weder in den Extrakten der analog zum Wildtyp und R13_{CDM} aufgearbeiteten kompletten Kulturlösungen noch in den separat aufgeschlossenen Bakterienpellets eine lipopeptidtypische Signalclusterung in den erwarteten m/z -Bereichen nachgewiesen werden, wofür mit Sicherheit die fehlende Proteinexpression verantwortlich war.

Abschließend wurden in ersten Vorversuchen die Veränderungen der hämolytischen und antibiotischen Eigenschaften des R13_{CDM}-Peptids infolge der Leucin-Deletion gegenüber dem Wildtyp-Surfactin überprüft. Die hämolytischen Aktivitäten wurden auf Blutagarplatten getestet, wobei sowohl die intakten Bakterienzellen als auch Methanolextrakte der Zellen aufgetragen wurden. Im Gegensatz zum nativen Surfactin konnte bei R13_{CDM} keinerlei Hofbildung nachgewiesen werden (Abb. 5.47).

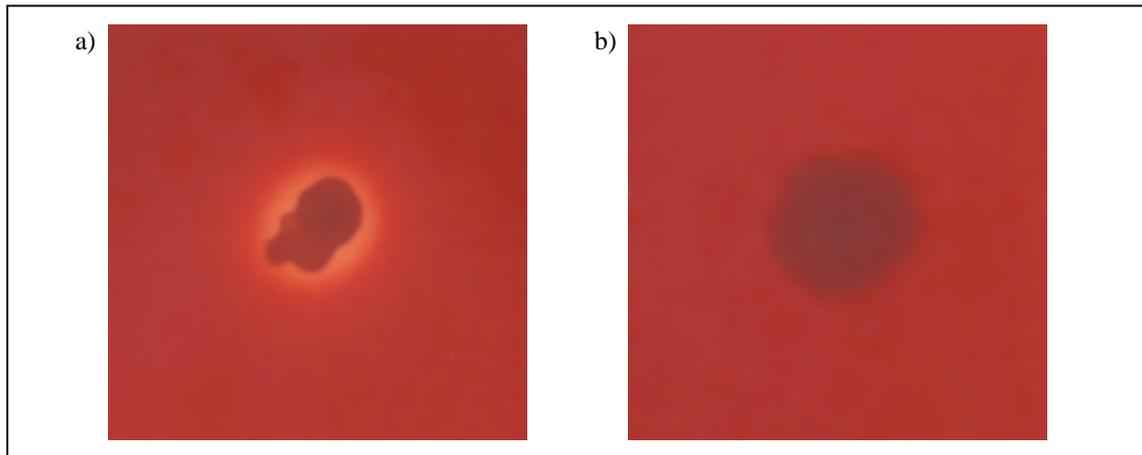


Abb. 5.47: Hämolyse durch natives Surfactin (a) und R13_{CDM}-Surfactin (b). Jeweils eine Bakterienkolonie wurde auf Blutagar bei 37 °C über Nacht inkubiert.

Zur Untersuchung der antimikrobiellen Aktivitäten wurden als Testorganismen jeweils ein Vertreter grampositiver (*Bacillus licheniformis*) und gramnegativer Bakterien (*E. coli* DH5 α) sowie eine Hefe (*Pichia pastoris*) ausgewählt. Diese wurden in LB-Agar (Bakterien) bzw. YPD-Agar (Hefe) eingegossen und zusammen mit den auf Zellglas gewachsenen Bakterienstämmen inkubiert. Nach dem Abzug der Zellglasfolie wurde unter allen *B. subtilis*-Kolonien eine Wachstumshemmung durch mehr oder weniger starke Hofbildung angezeigt. Während mit den beiden Testorganismen *E. coli* und *P. pastoris* keine Unterschiede zwischen Wildtyp und R13_{CDM} festgestellt werden konnten, verstärkte sich die Wachstumshemmung von *B. licheniformis* durch das R13_{CDM}-Peptid gegenüber dem Wildtyp-Surfactin (Abb. 5.48).

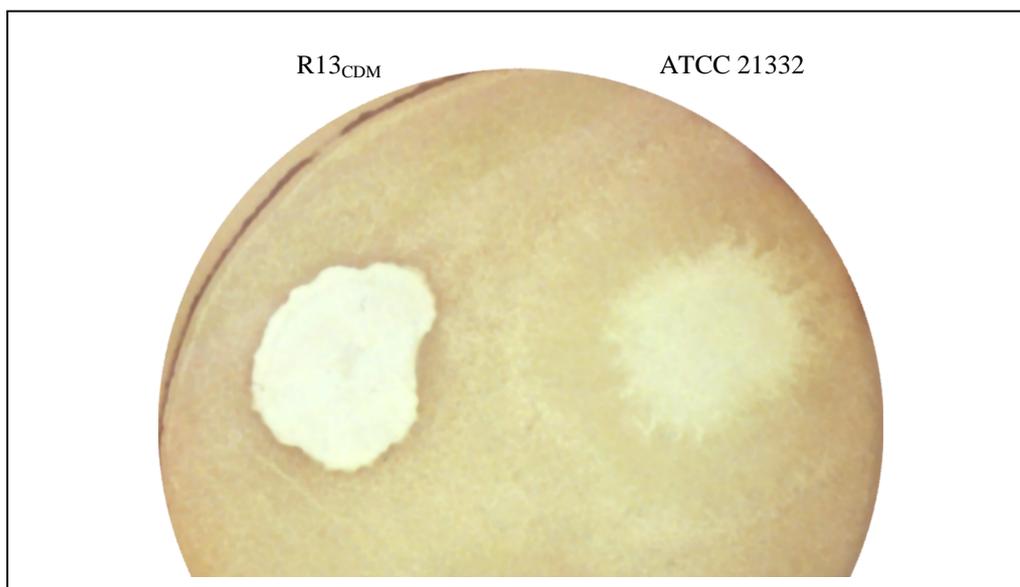


Abb. 5.48: Wachstumshemmung von *B. licheniformis* durch Surfactine, synthetisiert von *B. subtilis* R13_{CDM} und ATCC 21332

Beim Wildtyp wurde ein zentraler, aber nicht völlig gehemmter Hof mit einem diffusen Gürtel beobachtet, dessen Größe (Zentrum) etwa der Koloniegröße beim Auflegen der Zellfolie mit dem Wildtyp entsprach. Im Gegensatz dazu wurde das *B. licheniformis*-Wachstum unter der R13_{CDM}-Kolonie vollständig gehemmt, darüber hinaus besaß der Hof viel schärfere Grenzen (Abb. 5.48). Parallel wurden diese Versuche auch mit den Methanolextrakten durchgeführt, die jedoch an der Toxizität von Methanol für die Testorganismen scheiterten.