

Funktionelle und strukturelle Charakterisierung bakterieller
Peptidsynthetasen: Peptid-Engineering durch kombinatorische
Manipulation der Surfactin-Synthetase

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
vorgelegt dem Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

von
Diplom-Lebensmittelchemikerin / staatl. geprüfte Lebensmittelchemikerin
Hanka Symmank
aus Dresden

Berlin, im Oktober 2001

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juli 1996 bis September 2001 unter der Anleitung von Prof. Dr. Wolfram Saenger am Institut für Kristallographie im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie der Freien Universität Berlin durchgeführt.

Gutachter: Prof. Dr. Wolfram Saenger

Institut für Kristallographie, Freie Universität Berlin

Prof. Dr. Joachim Vater

Institut für Biochemie und Molekulare Biologie, Technische Universität Berlin

Eingereicht am 08.10.2001

Tag der mündlichen Prüfung: 19.04.2002

Zusammenfassung

Infolge ihres modularen Organisationsprinzips verfügen die Nichtribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS) über ein enormes Potential bei der Entwicklung innovativer neuer Wirkstoffe. Allerdings führte die Vernachlässigung interdomänischer Wechselwirkungen beim Protein-Engineering in der Vergangenheit zu zahlreichen Mißerfolgen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, den Einfluß unterschiedlicher Rekombinationsstrategien auf die einzelnen Enzymfunktionen systematisch zu untersuchen und so das nötige Rüstzeug für die biokombinatorische Neuverknüpfung der NRPS bereitzustellen.

Alle Module setzen sich aus wiederkehrenden funktionellen Domänen zusammen, die für die Adenylierung (A), Thioesterbindung (T) und Kondensation (C) der Peptidaminosäuren verantwortlich sind. Als Trägern der Substratspezifität kommt den A-Domänen eine Schlüsselrolle zu, der mit der detaillierten Analyse von zwei Mitgliedern der adenylatbildenden Familie Rechnung getragen werden sollte. Zum einen wurde dafür die autonom arbeitende Acetyl-CoA-Synthetase aus *Lysobacter sp.* ATCC 53042 gewählt, bei der nicht nur eine außergewöhnlich hohe Carbonsäuretoleranz festgestellt wurde, sondern überdies in Abhängigkeit von der Liganden-Kombination beachtliche Differenzen zwischen den Hin- und Rückreaktionen der zweistufigen Acyl-CoA-Synthese existierten. Zum anderen wurde das erste Modul Srf-M1 der Surfactin-Synthetase aus *B. subtilis* ATCC 21332 charakterisiert, das außer seinem Hauptsubstrat L-Glutaminsäure keine andere Aminosäure erkannte und aktivierte. Es besitzt zwei protease-sensitive Regionen, die genau der Scharnierregion zwischen den A-Subdomänen sowie dem Übergang von der C- zur A-Domäne entsprechen und vermutlich die Hauptursache für das Scheitern umfangreicher Kristallisationsversuche sind.

Im Hinblick auf das Hauptanliegen wurden nunmehr systematisch verschiedene Surfactin-Synthetase-Abschnitte und -Module neu miteinander verknüpft und der Einfluß der verschiedenen Rekombinationsstrategien untersucht. Als Modellenzyme wurden sowohl monomodulare Hybride aus den L-Valin- bzw. L-Leucin-aktivierenden Modulen Srf-M4 und Srf-M7 als auch bimodulare Hybridsynthetasen aus den L-Glutaminsäure- bzw. D-Leucin-aktivierenden Modulen Srf-M1 und Srf-M3 der trimodularen Surfactin-Synthetase SrfA-A konstruiert, wobei die Fusionen innerhalb aller drei Domärentypen A, T und C vorgenommen wurden. Von allen untersuchten Fusionsstellen ergab nur die Rekombination innerhalb des hochkonservierten His-Motivs eine voll funktionsfähige Peptidsynthetase, dagegen konnten bei anderen Manipulationen wie z.B. in der Scharnierregion der beiden A-Subdomänen oder im hochkonservierten T-Motiv nur noch Teilfunktionen nachgewiesen werden.

Nach Entfernung einer kompletten Moduleinheit produzierte die hybride Surfactin-Synthetase von *B. subtilis* R13_{CDM} *in vivo* entsprechend ihrer neuen Programmierung nur noch ein Lipohexapeptid. Es wäre vorstellbar, daß dieses Derivat vor allem wegen seiner geringeren Erythrocytentoxizität eine geeignete Alternative für das Wildtyp-Surfactin werden könnte.

Abstract

Due to their modular organization nonribosomal peptide synthetases (NRPS) offer a most promising target for the directed engineering of new bioactive compounds. However, the ignoring of interdomain interactions led to many failures in former module swapping experiments. Therefore this work was focussed on the systematic evaluation of possible recombination sites on their impact on distinct enzymatic functions to provide the required instruments for the biocombinatorial reorganization of NRPS.

Each module is at least composed of three functional domains responsible for the adenylation (A), thioester formation (T) and condensation (C) of the peptide amino acids. The A-domains determine the substrate specificity and thus play a key role in this process. This was taken into account by a detailed analysis of two members from the adenylate forming family. At first the autonomously acting acetyl-CoA synthetase from *Lysobacter sp.* ATCC 53042 was chosen, which accepts not only an unusually broad range of carboxylic acid substrates, but also shows considerable differences between the forward and reverse reactions of the two-step acyl-CoA synthesis in dependence on the provided ligand combinations. Secondly, the first module Srf-M1 of the surfactin synthetase from *B. subtilis* ATCC 21332 was characterized which was unable to recognize and activate other amino acids than its major substrate L-glutamic acid. It possesses two protease-sensitive regions corresponding exactly to the previously found hinge region dividing the A-domain into two subdomains as well as the linker area between the C- and the adjacent A-domain. These flexible regions represent the most obvious reasons for the failure of the extensive crystallization attempts.

In view of the main objective, the next step comprised the systematic rearrangement of distinct surfactin synthetase fragments and modules and the examination of the effects of the different recombination strategies. As model enzymes both monomodular hybrids between the coding regions of the L-valine and the L-leucine activating modules Srf-M4 and Srf-M7 and bimodular hybrid enzymes between the L-glutamic acid and the D-leucine activating modules Srf-M1 and Srf-M3 from the trimodular surfactin synthetase SrfA-A were generated in which fusion sites from all domain types A, T and C were used. It was demonstrated that only recombinations within the highly conserved His-motif resulted in a completely active peptide synthetase. By contrast, only partial catalytic competence was preserved by other manipulations like fusions within the hinge region between both A-subdomains or within the highly conserved T-motif.

After deletion of a complete module unit the recombinant surfactin synthetase from *B. subtilis* R13_{CDM} produced *in vivo* only a lipohexapeptide according to its new programming. Because of the reduced toxicity against erythrocytes it is conceivable that this derivative will become a suitable alternative for the wild type surfactin.

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	1
1	Einleitung und Problemstellung	2
2	Grundlagen und Theorie.....	5
2. 1	Modulare Organisation der nichtribosomalen Peptidsynthetasen	5
2. 2	Der Multienzym Thiotemplate Mechanismus	8
2. 3	Die funktionellen Domänen der nichtribosomalen Peptidsynthetasen.....	8
2. 3. 1	Die Adenylat-Domänen.....	9
2. 3. 2	Die Thiolations-Domäne	12
2. 3. 3	Die Kondensations-Domäne.....	13
2. 3. 4	Integrierte und assoziierte Thioesterasen	15
2. 3. 5	Modifizierende Domänen.....	16
2. 4	Die Surfactin-Synthetase	17
3	Material.....	20
3. 1	Mikroorganismen	20
3. 2	Plasmide	21
3. 3	Primer für die Polymerasekettenreaktion	23
3. 4	Chemikalien, Enzyme, Kits und Größenmarker	24
3. 5	Apparative Ausstattung und sonstige Materialien.....	25
3. 6	Medien, Agarplatten und Antibiotika.....	26
3. 7	Puffer und Lösungen	27
4	Methoden	30
4. 1	Aufbewahrung und Anzucht von Bakterien	30
4. 1. 1	Aufbewahrung der Mikroorganismenstämme.....	30
4. 1. 2	Anzucht von <i>E. coli</i> -, <i>B. subtilis</i> - und anderen Bakterienzellen sowie Hefen	30
4. 2	Methoden zur Isolierung, Analyse, Amplifikation und Rekombination von DNA	30
4. 2. 1	DNA-Isolierung.....	30
4. 2. 1. 1	Analytische Isolierung von Plasmid-DNA.....	30
A.	Analytische Isolierung von Plasmid-DNA durch alkalische Lyse nach <i>Birnboim</i>	30
B.	Analytische Isolierung von Plasmid-DNA nach dem <i>Qiagen Plasmid Mini Handbook</i>	31
4. 2. 1. 2	Präparative Isolierung von Plasmid-DNA.....	31
4. 2. 1. 3	Analytische Isolierung prokaryotischer chromosomaler DNA	31
4. 2. 1. 4	Präparative Isolierung prokaryotischer chromosomaler DNA	31
4. 2. 2	Amplifikation von DNA-Fragmenten durch die Polymerasekettenreaktion (PCR).....	32
4. 2. 3	Restriktion, Ligation und Dephosphorylierung von DNA	33
4. 2. 4	DNA-Elektrophorese.....	34
4. 2. 4. 1	Agarose-Flachbett-Gelelektrophorese.....	34
4. 2. 4. 2	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	35
4. 2. 5	Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	35
4. 2. 6	Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration.....	35
4. 2. 7	Transformation von <i>Escherichia coli</i> und <i>Bacillus subtilis</i>	36
4. 2. 7. 1	Herstellung und Transformation elektrokompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	36

4. 2. 7. 2	Herstellung und Transformation Calcium-kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen (nach Ehrlich).....	36
4. 2. 7. 3	Herstellung und Transformation von <i>B. subtilis</i> -Protoplasten	37
4. 2. 8	Koloniehybridisierung.....	38
4. 2. 8. 1	Kolonie-Blotting.....	38
4. 2. 8. 2	Markierung von DNA mit Digoxigenin	38
4. 2. 8. 3	DNA-DNA-Hybridisierung.....	39
4. 3	Methoden zur Isolierung und Charakterisierung von Proteinen	39
4. 3. 1	Überexpression von Proteinen in <i>E. coli</i>	39
4. 3. 2	Aufschluß von Bakterienzellen	40
4. 3. 2. 1	Zellaufschluß mittels der French® Press	40
4. 3. 2. 2	Alternativaufschluß von Bakterienzellen mit Lysozym.....	41
4. 3. 3	Ammoniumsulfatfällung von Proteinen	41
4. 3. 4	Proteinreinigung durch Affinitätschromatographie.....	41
4. 3. 4. 1	Affinitätschromatographie an Dextrin.....	41
4. 3. 4. 2	Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Agarose.....	42
4. 3. 5	Proteinreinigung durch Gelperfusionschromatographie	42
4. 3. 5. 1	Affinitätschromatographie an Metallchelate.....	43
4. 3. 5. 2	Anionenaustauschchromatographie.....	43
4. 3. 6	Proteinreinigung durch präparative Gelfiltration	44
4. 3. 7	Dialyse von Proteinlösungen.....	44
4. 3. 8	Aufkonzentrieren von Proteinlösungen.....	44
4. 3. 9	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	44
4. 3. 10	Photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.....	45
4. 3. 11	Molekulargewichtsbestimmung von Srf-M1 durch analytische Gelfiltration.....	45
4. 3. 12	Dynamische Lichtstreuung.....	46
4. 4	<i>In vitro</i> -Bestimmung enzymatischer Aktivitäten	46
4. 4. 1	Bestimmung der Enzymaktivitäten der Acetyl-CoA-Synthetase.....	46
4. 4. 1. 1	Photometrische Bestimmung der Acylhydroxamatbildung im Hydroxamattest	46
4. 4. 1. 2	Radioaktive Bestimmung der Acyladenylatbildung mittels ATP-PP ₁ -Austausch	47
4. 4. 1. 3	Radioaktive Bestimmung der Acyladenylatbildung durch ATP-Hydrolyse.....	47
4. 4. 1. 4	Dünnschichtchromatographische Bestimmung der Acyladenylatbildung	47
4. 4. 2	Bestimmung der Enzymaktivitäten der Surfactin-Synthetase-Module	48
4. 4. 2. 1	Radioaktive Bestimmung der Aminoacyladenylatbildung mittels ATP-PP ₁ -Austausch sowie durch ATP-Hydrolyse	48
4. 4. 2. 2	Thioesterbeladung	48
4. 4. 2. 3	Dünnschichtchromatographische Bestimmung der Aminosäureadenylatbildung.....	48
4. 5	<i>In vivo</i> -Biosynthese von Surfactin und -analoga.....	49
4. 5. 1	Isolierung von Surfactin und -analoga	49
4. 5. 2	Charakterisierung von Surfactin und -analoga.....	49
4. 5. 2. 1	Dünnschichtchromatographie von Surfactin und -analoga	49
4. 5. 2. 2	MALDI-massenspektrometrische Analyse von Surfactin und -analoga.....	49
4. 5. 2. 3	Bestimmung der biologischen Aktivitäten von Surfactin und -analoga.....	50
4. 6	Synthese von 3-Hydroxytetradecanoyl-Coenzym A.....	50
4. 7	Kristallisationsansätze	51
5	Ergebnisse.....	52
5. 1	Enzymatische Charakterisierung der Acetyl-CoA-Synthetase von <i>Lyso bacter sp.</i> ATCC 53042.....	52

5. 1. 1	Heterologe Expression des <i>acsL</i> -Gens in <i>E. coli</i> und Aufreinigung des AcsL-Proteins	52
5. 1. 2	Bestimmung der spezifischen Aktivität des AcsL-Proteins und Optimierung der Reaktionsbedingungen	53
5. 1. 3	Bestimmung der Carbonsäure- und Nukleotidspezifität des AcsL-Proteins	55
5. 1. 4	Analyse der Adenylierungsreaktion mit den Substraten Propionat und Isobutyrat	57
5. 1. 5	Untersuchung der Adenylierungsreaktion in Abhängigkeit von der CoA- und PP _i -Konzentration	59
5. 2	Enzymatische und strukturelle Charakterisierung der A-Domäne des Glutaminsäure-aktivierenden Startmoduls der Surfactin-Synthetase Srf-M1	60
5. 2. 1	Heterologe Expression und Reinigung der Glutaminsäure- und Leucin-aktivierenden Module Srf-M1 und SrfA-C _{S1003A}	60
5. 2. 2	Enzymatische Charakterisierung des Glutaminsäure-aktivierenden Moduls Srf-M1	63
5. 2. 3	Einfluß von N- und C-terminalen Deletionen auf die spezifische Aktivität des Glutaminsäure-aktivierenden Moduls Srf-M1	66
5. 2. 4	Dünnschichtchromatographische Untersuchung der Aminoacyladenylatbildung durch Srf-M1, Srf-M4 und SrfA-C _{S1003A}	67
5. 2. 5	Strukturelle Untersuchungen des Proteins Srf-M1 mittels dynamischer Lichtstreuung, analytischer Gelfiltration und Kristallisationsexperimente	68
5. 2. 5. 1	Untersuchung von Srf-M1 mittels dynamischer Lichtstreuung	68
5. 2. 5. 2	Untersuchung von Srf-M1 mittels analytischer Gelfiltration	69
5. 2. 5. 3	Kristallisationsuntersuchungen von Srf-M1 und Srf-M1ΔC	70
5. 3	<i>In vitro</i> -Rekombination von Surfactin-Synthetase-Genen und enzymatische Charakterisierung der resultierenden Hybridenzyme	75
5. 3. 1	Überproduktion der trimodularen Surfactin-Synthetase-Untereinheit SrfA-A durch Coexpression mit den <i>E. coli</i> -Chaperonen GroES/EL	75
5. 3. 2	Strukturelle Untersuchungen der Surfactin-Synthetase-Untereinheit SrfA-A mittels Elektronenmikroskopie	76
5. 3. 3	Heterologe Expression und Reinigung der 4'-Phosphopantetheinyltransferase Sfp	78
5. 3. 4	<i>In vitro</i> -Rekombination von Surfactin-Synthetase-Modulen	79
5. 3. 4. 1	Konstruktion hybrider Surfactin-Synthetase-Module aus dem Valin-aktivierenden Modul Srf-M4 und dem Leucin-aktivierenden Modul Srf-M7	79
5. 3. 4. 2	Konstruktion bimodularer Hybride durch Deletion des zentralen Leucin-aktivierenden Moduls von der trimodularen Surfactin-Synthetase SrfA-A	80
5. 3. 4. 3	Heterologe Expression und Reinigung der mono- und bimodularen Hybridenzyme	82
5. 3. 5	Enzymatische Charakterisierung von SrfA-A und Konsequenzen des Protein-Engineerings auf die Adenylierungs- und Thiolierungsfunktion der rekombinanten Enzyme	87
5. 3. 5. 1	Rekombination innerhalb der A-Domäne	88
5. 3. 5. 2	Rekombination innerhalb der T-Domäne	90
5. 3. 5. 3	Rekombination innerhalb der C-Domäne	91
5. 4	<i>In vivo</i> -Rekombination von Surfactin-Synthetase-Genen in <i>B. subtilis</i> und Charakterisierung der resultierenden Deletions- und Austauschmutanten der Surfactin-Synthetase	93
5. 4. 1	<i>In vivo</i> -Rekombination von Surfactin-Synthetase-Genen in <i>B. subtilis</i>	93
5. 4. 2	Phänotypische und enzymatische Charakterisierung der rekombinanten Surfactin-Synthetase-Systeme	101

6	Diskussion	110
7	Literatur	121
8	Anhang.....	130
9	Veröffentlichungen und Präsentationen.....	135

Abkürzungsverzeichnis

A, T, C-Domänen	Adenylierungs-, Thiolierungs- bzw. Kondensations-Domänen
AcsL	Acetyl-CoA-Synthetase von <i>Lysobacter sp.</i> ATCC 53042
Amp	Ampicillin
AMP, ADP, ATP	Adenosinmonophosphat (bzw. -di- und -triphosphat)
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATCC	American Type Culture Collection
ATP- γ -S	Adenosin-O-(γ -thiotriphosphat)
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin (engl. bovine serum albumin)
Cm	Chloramphenicol
CoA	Coenzym A
cpm	Zählimpulse pro Minute (engl. counts per minute)
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Glu, Leu, Val, Asp, Phe	Glutaminsäure, Leucin, Valin, Asparaginsäure, Phenylalanin
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino]-ethansulfonsäure
IPTG	Isopropylthio- β -galactopyranosid
kDa	Kilodalton
MES	4-Morpholinoethansulfonsäure
MW	Molekulargewicht
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP _i	Pyrophosphat
psi	pounds / inch ²
R _f	Retentionswert
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro min (engl. rounds per minute)
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. sodium dodecyl sulfate)
Srf-M1, M2, M3, ...	Module der Surfactin-Synthetase
TE	Tris/EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminopropan
U	Unit (Einheit der enzymatischen Aktivität)
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid

8 Anhang

<i>M.soeh</i>	VL--KLAGKEDKK-LKTTVFQDETRIFNPPKELVEKSIVMQWMKKKGFKTEKEMR	52
<i>E.coli</i>	MS--QI----HKH-----TI---PANIADRCLI---NP-QQYEAMYQ--	29
<i>A.eutr</i>	MS--AIESVMQEH-----RVFNPPPEGFASQAAI---PSMEAYQALCD--	37
<i>L.spec</i>	MR-----YEE----FHRR-----	9
<i>B.subt</i>	MNLKALPAIEGDHWLKN--YEETYRHFD-----	26
<i>M.soeh</i>	AWCSSDEHYLEFWDEMAKTYVDWHKPYTKVMDDSEMP---YFHWFTGGEINITYN	104
<i>E.coli</i>	---QSINVPDTFWGEQGK-ILDWIKPYQKVKNTSFAPGNVSIKWYEDGTLNLAAN	80
<i>A.eutr</i>	---EAERDYEGFWARHARELLHWTKPFTKVLDQSNAP---FYKWFEDGE LNASYN	86
<i>L.spec</i>	----SIEQPEAFWAEQARA-IHWRTPPQRILDYSNPP---FRQWFAGGETNLCYN	56
<i>B.subt</i>	-----WAEAEKHF-----SWHETGKLNAAEY	47
	* . * * *	
<i>M.soeh</i>	AVDRHAKGAKKDKVAYIWIPEPTDQPVQKITYGDLYKEVNKFANGLKSLG-LKKG	158
<i>E.coli</i>	CLDRHLQE-NGDRTAIIWEGDDASQS-KHISYKELHRDVCRFANTLLELG-ICKG	132
<i>A.eutr</i>	CLDRNLQNGNADKVAIVFEADDGSVT-R-VTYRELHGKVCRFANGLKALG-IRKG	138
<i>L.spec</i>	ALDRHLDE-RGDQLALVTISSETGQT-RELSYRQVHREVN VFASAIRALG-VGRG	108
<i>B.subt</i>	AIDRHAESFRKNKVALYYKDAKRDE---KYTFKEMKEESNRAGNVLRRYGNVEKG	99
	. ** * .. . * . . *	
I		
<i>M.soeh</i>	DRVSIYMP -MIPQLPIAMLACAKLGVSHIVVFSGFSSKGLMDRAAHCGSRAIITV	212
<i>E.coli</i>	DVVAIYMP -MVPEAAVAMLACARIGAVHSVIFGGFSPEAVAGRIIDSNSRLVITS	186
<i>A.eutr</i>	DRVVIYMP -MSVEGVVAMQACARLGATHSVVFGGFSAKSLQERLVDVGAVALITA	192
<i>L.spec</i>	DRVVIYMP NMAAEAVFAMLACARIGAVHSVVFGGFAAHNLALRIDDATPKLLICA	163
<i>B.subt</i>	DRVFI FMPR -SPELYFIMLGAIKIGAIAGPLFEAFMEGAVKDRLENSEAKVVVTT	153
	* * * . ** * .. * * . * ..	
<i>M.soeh</i>	DGFYRRGKPVPLKPNADAEA--AGGAPSVEKIIVYKRAGVDVSMKEGRDVVWHDLV	265
<i>E.coli</i>	DEGVRAGRSIPLKKNVDDALKPNPNTSVEHVVLKRTGGKIDWQEGRDLVWHDLV	241
<i>A.eutr</i>	DEQMRGGKALPLKAIADDALALGGCEAVRNVIYVRRRTGGKVAWTEGRDRWMEDVS	247
<i>L.spec</i>	DAGMRGGKVIIPYKPLVDAACAEAQSPPHVLVVSRLDPDLRLIPGRDVDYAALR	218
<i>B.subt</i>	PELLERIPVDKPLPHLQHV FVVGGEAESGTNI INYDEAA-----	191
	..	
II		
<i>M.soeh</i>	KGQSE-ECEPVVVDPEHRLYILYTSGTTGKPKGIEHATGGNAVGPAQTLHWVFDL	319
<i>E.coli</i>	EQASD-QHQAEEMNAEDPLFILYTSGSTGKPKGV LH TTGGYL VYAALTFKYVFDY	295
<i>A.eutr</i>	AGQPD-TCEAEPVSAEHPLFVL YTSGSTGKPKGVQHSTGGYLLWALMTMKWTFDI	301
<i>L.spec</i>	TQHEDAQVEVEWLESNEPSYLLYTSGTTGKPKGVQRDVGGYAVGLALSMWAIYDI	273
<i>B.subt</i>	-KQESTRLDIEWMDKKDGFLHLYTSGSTGTPKGV LHVHEA-MIQQYQTGKWVLDL	244
	. **** . ** * * . . *	
<i>M.soeh</i>	KDDD VVWCTADIGWVTGHSYIVYAPLILGMTSLMYEGAADYPDFGRWWKNIQDHK	374
<i>E.coli</i>	HPGDIYWCTADVGVVTGHSYLLYGPLACGATTLMFEGVPNWPTPARMAQVVDKHQ	350
<i>A.eutr</i>	KPDDLFWCTADIGWVTGHTYIAYGPLAAAGATQVVFEGVPTYPNAGR FWDMIARHK	356
<i>L.spec</i>	RAGQVMFSTSDVGWAVGHSYNVYGPLIAGATSVLYEGLPTNPDPGVWWSICERYG	328
<i>B.subt</i>	KEEDIYWCTADPGWVTGTVYGFIFAPWLNGATNVIVGGRFS---PESWYGTIEQLG	296
	. * * * * * * . * * * . *	

<i>M.soeh</i>	VTVLYTAPTAVRMFMKQGAE----WPKYDLSLRLLGSVGEPINPEAWMWYREH	425
<i>E.coli</i>	VNILYTAPTALRALM--AEGDKAIEGT--DRSSLRILGSGVGEPIPEAWEWYWK	401
<i>A.eutr</i>	VSIFYTAPTALRSLIKAAEADEKIHPKQYDLSLRLLGTVGEPINPEAWMWYK	411
<i>L.spec</i>	VRTMFSSTGIRVLKKQDAA----WLKKHDLALHFLAGEPLDEPTAHWITDG	379
<i>B.subt</i>	VNVWYSAPTAFRMLMGAGDE----MAAKYDLTSLRHVLSVGEPLNPEVIRWGHKV	347
	* . . ** * * . * . *** . *	
III		
<i>M.soeh</i>	IGRGELQIMDTW WQTETG TFLNSPLP-IT--PLKPGSCTFPLPGYDISILDEE-G	476
<i>E.coli</i>	IGNEKCPVVDTW WQTETG GFMITPLPGAT--ELKAGSATRPFPGVQPALVDNE-G	453
<i>A.eutr</i>	IGNERCPIVDTF WQTETG GHHMITPLPGAT--PLVPGSCTLPLPGIMAAIVDET-G	463
<i>L.spec</i>	IGKT---VIDNY WQTETG WPVLALMPGLDLKPKVFGSPGLPMPGYHLRVIDEATG	431
<i>B.subt</i>	FNK---RIHDTW WMTETG SQLICNYPCMDIKP---GSMGKPIPGVEAAIVDNQ-G	395
	. * * **** * * * * * * * . . * *	
<i>M.soeh</i>	NEVPLGSGGNIVALKPYPSPM-LRAFWDKERFMKEYWQFYWDVPGRRGVYLAGDK	530
<i>E.coli</i>	NPLEGATEGSLVITDSWPGQ-ARTLFGDHERFEQTY---FSTF--KN-MYFSGDG	501
<i>A.eutr</i>	HDVPNGNGGILVVKRPWPAM-IRTIWGDPERFRKSY---FPEELGGK-LYLAGDG	513
<i>L.spec</i>	RDVGPNEKGVLTIVPPLPPGCLSTVWVNDARFLTSYFGHFKELEL-----LYSSLDW	481
<i>B.subt</i>	NELPPYRMGNLAIKKGWPSM-MHTIWNNEPKY-ESYF-----MPG--GWVVS GDS	441
	. * . * * * * * * * * * * * * * * *	
IV V		
<i>M.soeh</i>	AQRDKD-GYFFIQ GRIDDVL SVAGHRIANAEEVESALVAHPKIA AEAAVVG KPDEVK	584
<i>E.coli</i>	ARRDED-GYYWIT GRVDDVL NVSGHRLGTAEIESALVAHPKIA AEAAVVG I PHNIK	555
<i>A.eutr</i>	SIRDKDTGYFTIM GRIDDVL NVSGHRMGTMEIESALVSNPLV AEAAVVG RPDDMT	568
<i>L.spec</i>	AIRDED-GYTFIL GRTDDV INVAGHRLGTREIEESVASHASV AEAAVIG VHDELK	535
<i>B.subt</i>	AYMDEE-GYFWFQ GRVDDV IMTSGERVGPFVEVESKLVHEHPAIA AEAGVIG KPDPVR	495
	* . ** * * . * * * * * * * * * * * * * * *	
VI		
<i>M.soeh</i>	GESIVAFVIL---RVGNEPSPELAKDAIAFVRKTLGPVAAAPTEVHFVNDLP KTRS	636
<i>E.coli</i>	GQAIYAYVTLNHG---EEPSPELYAEVRNWRKEIGPLATPDVLHWTDSPL KTRS	607
<i>A.eutr</i>	GEAICAFVVLKRSRPTGEEAVKIA TELRNWVGKEIGPIAKPKDIRFGDNL PKTRS	623
<i>L.spec</i>	GQVPVVFATLKAG--DAHDPHAVATGMQDCVVRQLGAVARPARVYVVAAL PKTRS	588
<i>B.subt</i>	GEI IKAFIAL---REGFEP SDKLKEEIRLFVKQGLAAHAAPREIEFKDKLP KTRS	547
	* . * * * * * * * * * * * * * * *	
<i>M.soeh</i>	GKIMRR VVKARALGNPV--GDI STL MNPEAVD-----GIPKIV	672
<i>E.coli</i>	GKIMRR ILRKIAAGDTSNLGDTSTLADPGVVEKLEE-KQAIAMPS	652
<i>A.eutr</i>	GKIMRR LLRSLAKGEEIT-QDTSTLENPAILEQL----KQA----Q	660
<i>L.spec</i>	GKLLRR SIQALAESRDP--GDLSTLDDPGALEEVRRALER GADAGG	632
<i>B.subt</i>	GKIMRR VLKAWELNLP--GDLSTMED-----	572
	** . ** . * **	

Anhang 1: Alignment der Acetyl-CoA-Synthetasen von *Methanothrix soehngenii* (Eggen et al., 1991), *Escherichia coli* (Blattner et al., 1993), *Alcaligenes eutrophus* (Priefert and Steinbüchel, 1992), *Lysobacter sp.* ATCC 53042 und *Bacillus subtilis* (Grundy et al., 1993). Identische Aminosäurereste wurden mit einem Stern und homologe Reste mit einem Punkt markiert. In Fettdruck wurden die konservierten Sequenzmotive hervorgehoben.

Enzym	Schnittstelle	<i>srfA-A</i>	<i>srfA-B</i>	<i>srfA-C</i>
<i>AvrII</i>	C'CTAGG	(Fusion)	-	-
<i>BamHI</i>	G'GATCC	-	-	-
<i>BglII</i>	A'GATCT	1976, 9282	13706, 14394, 15198, 18021, 18237	23649
<i>EcoRI</i>	G'AATTC	9230, 10036	16559, 20006	-
<i>HindIII</i>	A'AGCTT	3143, 3783, 4432, 5333, 7924, 9979	12295, 14275, 14896, 15081, 16291, 17688	21990, 22780, 24646, 24970
<i>KpnI</i>	GGTAC'C	-	16662	-
<i>MluI</i>	A'CGCGT	1268, 2279, 5093, 8177	14684, 18953	-
<i>NotI</i>	GC'GGCCGC	3426	15161	-
<i>PstI</i>	CTGCA'G	1895, 2393, 4938, 9636	11178, 13163, 15216	22355, 22544, 22559, 24221, 24902, 25331
<i>SacI</i>	GAGCT'C	1027, 3737, 8834, 9314	15911, 16655, 19610	24626
<i>Sall</i>	G'TCGAC	2851	19834	-
<i>SphI</i>	GCATG'C	2770, 5270, 5881, 10282	11743, 12375	-
<i>XbaI</i>	T'CTAGA	-	-	-

Anhang 2: Restriktionsschnittstellen der Surfactin-Synthetase. Es wurden nur die in der Arbeit verwendeten Enzyme mit ihren entsprechenden Schnittstellen aufgelistet.

Anhang 3: Sequenz-Alignment des Glutaminsäure-aktivierenden Moduls Srf-M1 der Surfactin-Synthetase (Srf (Glu)) mit der PheA-Domäne der Gramicidin-Synthetase (Grs (Phe); Conti et al., 1997) und der Glühwürmchen-Luciferase aus *Photinus pyralis* (Conti et al., 1996). Dabei wurden identische bzw. homologe Aminosäurereste durch gelbe bzw. grüne Buchstaben kenntlich gemacht. Über den Aminosäuresequenzen der Gramicidin-Synthetase und der Luciferase sind die in den Kristallstrukturen nachgewiesenen Sekundärstrukturelemente verschiedenfarbig dargestellt, Pfeile stehen für β -Faltblätter und Zylinder für α -Helices. In rot wurden die zur großen N-terminalen Subdomäne gehörigen Strukturelemente gekennzeichnet und in blau die zur kleineren C-terminalen Subdomäne gehörigen Komponenten. Durch Kleinbuchstaben wurden im Modell nicht sichtbare Aminosäuren markiert. Zuzüglich wurden in grauen Boxen die für alle adenylatbildenden Enzyme typischen Sequenzmotive A1 bis A10 hervorgehoben. Die C-terminalen Begrenzungen der Enzyme Srf-M1 und Srf-M1 Δ C wurden ebenfalls markiert.

9 Veröffentlichungen und Präsentationen

Symmank, H., Saenger, W. and Bernhard, F. (1999). Analysis of engineered multifunctional peptide synthetases: enzymatic characterization of surfactin synthetase domains in hybrid bimodular systems. *J. Biol. Chem.* **274**, 21581-21588

Symmank, H., Franke, P., Saenger, W. and Bernhard, F. (in Vorbereitung) Modification of biological active peptides: production of a novel lipohexapeptide after engineering of *Bacillus subtilis* surfactin synthetase. *Protein Engineering*

Symmank, H., Engert, H., Saenger, W. and Bernhard, F. (1996). Heterologous expression and characterization of an acetyl-CoA-synthetase from the gliding Gram-negative bacterium *Lysobacter sp.* ATCC 53042.

Symposium of the Special Research Group *Integrated Enzyme Systems* "Enzymology of Biosynthesis of Natural Products" in Berlin, 22.09. – 25.09.1996, Poster

Symmank, H., Saenger, W. and Bernhard, F. (1998). Isolation and molecular characterization of an acyl-CoA forming enzyme from *Lysobacter sp.* ATCC 53042: modulation of the enzymatic activity by different ligand combinations.

International Symposium "Biochemical Principles and Mechanisms of Biosynthesis and Biodegradation of Polymers" in Münster, 03.06. – 06.06.1998, Poster

Symmank, H., Saenger, W. and Bernhard, F. (2000). Engineering of antibiotic production: Genetic recombination of peptide synthetases.

Biotechnology 2000, The World Congress on Biotechnology, 11th International Biotechnology Symposium and Exhibition in Berlin 03.09. – 08.09.2000, Poster

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen ganz herzlich bedanken, die auf vielerlei Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt dabei:

Prof. Dr. Wolfram Saenger für seine konstruktive Kritik und die Bereitstellung der hervorragenden Arbeitsmöglichkeiten in seinem Labor am Institut für Kristallographie der Freien Universität Berlin,

Prof. Dr. Joachim Vater für die freundliche Übernahme des Korreferates,

Dr. Frank Bernhard für die ausgezeichnete Betreuung und die anregenden Diskussionen,

Dr. Werner Schröder für den „Übernacht-Service“ bei der Synthese von Oligonukleotiden,

Dr. Yannis Georgalis und Dr. Patrick Umbach für die durchgeführten Messungen zur dynamischen Lichtstreuung, Dr. Peter Franke für die massenspektrometrischen Analysen sowie Dr. Michael Hoppert (Universität Göttingen) für die Durchführung der elektronenmikroskopischen Untersuchungen,

dem leider viel zu früh verstorbenen Heinz Engert für die Begleitung meiner ersten Schritte auf dem Gebiet der Antibiotikasyntethasen,

meinen zahlreichen Mitstreitern, insbesondere Markus Wehland-von Trebra, Anton Meinhardt und Robert Schultze-Heienbrock für den stimulierenden Gedankenaustausch und ihre stete Hilfsbereitschaft,

Clemens Langner, Rita Diehl und Claudia Alings für jegliche Unterstützung bei der Laborarbeit,

„meinen“ geduldigen Azubis André Pour Esmailyeh, Thi Thu Uyen Vu, Steffi Bernhardt und Marika Schöffmann, die mir (fast) jeden Wunsch erfüllten,

sowie allen übrigen nicht namentlich genannten Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe für die gute Zusammenarbeit und die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre.

Und nicht zuletzt möchte ich mich ganz besonders bei Carsten, meiner Familie und meinen Freunden bedanken, ohne deren Unterstützung und Geduld die Arbeit nicht zu dem geworden wäre was sie geworden ist.