

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
21. Dezember 2000 (21.12.2000)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 00/77220 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/52, 15/54, 15/62, 9/10, C12P 13/04, 21/02 (71) Anmelder und
(72) Erfinder: KELLER, Ullrich [DE/DE]; Selbitzerstr. 16 c, D-14089 Berlin (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE00/01950 (72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SCHAUWECKER, Florian [DE/DE]; Herderstr. 35, D-12163 Berlin (DE).
- (22) Internationales Anmeldedatum: 15. Juni 2000 (15.06.2000)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch (74) Anwalt: NOBBE, Matthias; Viering, Jentschura & Partner, Essener Strasse 5, D-46047 Oberhausen (DE).
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität: 199 28 313.3 16. Juni 1999 (16.06.1999) DE (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR,

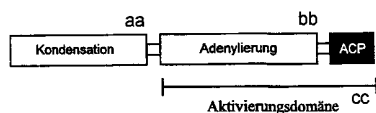
[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD OF MODIFYING PEPTIDE SYNTHETASES SUCH THAT THEY CAN N-METHYLATE THEIR SUBSTRATE AMINO ACIDS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR VERÄNDERUNG VON PEPTIDSYNTHETASEN IN DER WEISE, DASS SIE IHRE SUBSTRATAMINOSÄUREN N-METHYLIEREN KÖNNEN

Abbildung 1: Modul einer PPS und Unterteilung in funktionelle Domänen

A: Minimal-Modul einer PPS



B: Modul mit N-Methyltransferase-Domäne

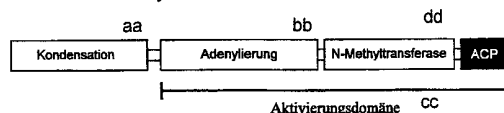


FIGURE 1: MODULE OF A PPS AND
SUBDIVISION INTO FUNCTIONAL DOMAINS

A: MINIMAL MODULE OF A PPS

aa...CONDENSATION

bb...ADENYLATION

cc...ACTIVATION DOMAIN

B: MODULE WITH N-METHYL TRANSFERASE DOMAIN

dd...N-METHYL TRANSFERASE

(57) Abstract: The invention relates to a method of modifying peptide synthetases in such a manner that they can N-methylate their substrate amino acids. PPS are enzymes that synthesize peptides in a non-ribosomal manner. The peptides synthesized by PPS (or the derivatives originating therefrom) are often of pharmaceutical value. PPS have a modular set-up. Each module has an activation domain which recognizes and covalently binds to the respective substrate amino acid. The peptide synthesis catalyzed by PPS proceeds by the condensation of the covalently bound substrate amino acids. A minor number of the known activation domains is capable of also N-methylating the bound substrate amino acids. The inventive method allows conversion of the activation domains without N-methyl transferase activity to activation domains with N-methyl transferase activity while maintaining the original substrate specificity. It is thus possible to provide for every specificity of a given PPS module a corresponding module derivative with additional N-methyl transferase activity. These derivatives can be used to construct novel or modified PPS and the synthesized peptide is then N-methylated at the desired peptide bonds. The inventive method facilitates the synthesis of novel peptides with potential novel pharmacological properties.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]



HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

Veröffentlicht:

— Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

- (84) **Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft die Veränderung von Peptidsynthetasen (PPS) in der Weise, daß sie ihre Substrataminosäuren N-methylieren können. PPS sind Enzyme, die Peptide auf nicht-ribosomale Weise synthetisieren. Die von den PPS synthetisierten Peptide (oder die daraus hervorgehenden Derivate) sind oft von pharmazeutischem Interesse. Die PPS sind modular aufgebaut. Jedes Modul besitzt eine Aktivierungsdomäne, welche die jeweilige Substrataminosäure erkennt und kovalent bindet. Die von der PPS katalysierte Peptidsynthese erfolgt dann durch die Kondensation der kovalent gebundenen Substrataminosäuren. Eine geringe Anzahl der bekannten Aktivierungsdomänen ist in der Lage, die gebundenen Substrataminosäuren auch zu N-methylieren. Die hier beschriebene Erfindung ermöglicht die Umwandlung von Aktivierungsdomänen ohne N-Methyltransferase-Aktivität in Aktivierungsdomänen mit N-Methyltransferase-Aktivität, wobei die ursprüngliche Substratspezifität erhalten bleibt. Für jede Spezifität eines vorhandenen PPS-Moduls kann somit ein entsprechendes Modul-Derivat mit zusätzlicher N-Methyltransferase-Aktivität bereitgestellt werden. Diese Derivate können dann dazu genutzt werden, neue oder modifizierte PPS zu konstruieren, wodurch das synthetisierte Peptid dann an den gewünschten Peptidbindungen N-methyliert ist. Dies ermöglicht die Synthese neuer Peptide mit möglichen neuen pharmakologischen Eigenschaften.

Verfahren zur Veränderung von Peptidsynthetasen in der Weise, daß sie ihre Substrataminosäuren N-methylieren können.

Beschreibung

Die Erfindung betrifft die Veränderung von Peptidsynthetasen (PPS) in der Weise, daß sie ihre Substrataminosäuren N-methylieren können. Dies wird durch eine gezielte Modifikation oder Austausch der funktionellen Untereinheiten (Aktivierungsdomänen) dieser Enzyme erreicht.

Peptidsynthetasen (PPS) sind Enzyme, die Peptide auf nicht-ribosomale Weise synthetisieren. Die von den PPS synthetisierten Peptide (oder die daraus hervorgehenden Derivate) sind oft von pharmazeutischem Interesse, wie beispielsweise die Penicilline, Vancomycin, Cephalosporin, Pristinamycin oder das Actinomycin D. Die PPS sind modular aufgebaut. Jedes Modul einer PPS erkennt, aktiviert und bindet jeweils eine Aminosäure. Einige PPS-Module akzeptieren auch ungewöhnliche (nicht proteinogene) Aminosäuren als Substrate, wie beispielsweise die alpha-Aminoadipinsäure (in Penicillin) oder das Phenylglycin (in Pristinamycin). Die von der PPS katalysierte Synthese eines Peptides erfolgt durch die enzymkatalysierte Kondensation der an den Modulen gebundenen Aminosäuren. Diese Kondensation ist gerichtet, und zwar in der Weise, daß die am ersten Modul der PPS (bezogen auf den N-Terminus der PPS) gebundene Substrataminosäure den Anfang (N-Terminus) des synthetisierten Peptids bildet. Somit bestimmt die Anzahl und die Reihenfolge der Module innerhalb einer PPS die Länge und die Sequenz des synthetisierten Peptides (Kleinkauf H., von Döhren H. (1990) Eur. J. Biochem. 192:1-15). Dies ist von entscheidender Bedeutung, da bei einem Austausch bzw. dem Einfügen oder Deletieren von PPS-Modulen auf genetischem Wege die Struktur des danach gebildete Produkt vorhersagbar ist.

Allen bekannten PPS-Modulen ist gemeinsam, daß sie sich aus mindestens drei funktionellen Domänen zusammensetzen (Abbildung 1A). Diese drei Domänen sind (1) die Adenylierungs-Domäne, notwendig für die Erkennung und Adenylierung der Substrataminosäure, und (2) die ACP-Domäne, notwendig für die kovalente Bindung der adenylierten Aminosäure in Form eines Thioesters und (3) die Kondensationsdomäne, notwendig zur Kondensation aller an der PPS gebundenen Aminosäuren zum synthetisierten Peptid (Stachelhaus *et al.* (1995) FEMS Microbiol. Lett. 125:3-14). Die Adenylierungs-Domäne und ACP-Domäne werden zusammen auch als Aktivierungsdomäne bezeichnet (Abbildung 1A), da sie zusammen die Erkennung und kovalente Bindung der Substrataminosäure in Form eines reaktiven Thioesters ermöglichen. Eine besondere Gruppe bilden jene Aktivierungsdomänen, die ihre Substrataminosäuren nach der kovalenten Bindung auch N-methylieren können. Bei PPS mit solchen Aktivierungsdomänen enthält folglich das bei der nachfolgenden Kondensation entstehende Peptid auch N-methylierte Aminosäuren. Die Zahl der zur Zeit bekannten bzw. klonierten Gene kodierend für Aktivierungsdomänen mit N-Methyltransferase-Aktivität (11 Domänen) ist jedoch deutlich geringer als die Zahl der Aktivierungsdomänen ohne N-Methyltransferase-Aktivität (über 80

Domänen). Zudem zeigen viele der Aktivierungsdomänen mit N-Methyltransferase-Aktivität eine vergleichbare Substrataktivität, wie z.B. für die Aminosäure Valin in den Modulen der Actinomycin Synthetase II aus *Streptomyces chrysomallus* (Schauwecker *et al.* (1998) J. Bacteriol. 180 : 2468-2474), der Cyclosporin Synthetase aus *Tolypocladium niveum* (Weber *et al.* (1994) Cur. Genet. 26:120-125) und der Enniatin Synthetase aus *Fusarium scirpi* (Haese *et al.* (1993) Mol. Microbiol. 7:905-914).

Die hier beschriebene Erfindung ist deshalb von Bedeutung, da sie auch die Umwandlung von Aktivierungsdomänen ohne N-Methyltransferase-Aktivität in Aktivierungsdomänen mit N-Methyltransferase-Aktivität beschreibt, wobei die ursprüngliche Aminosäure-Substratspezifität erhalten bleibt. Für jede Spezifität eines vorhandenen PPS-Moduls kann somit ein entsprechendes Modul-Derivat mit zusätzlicher N-Methyltransferase-Aktivität bereitgestellt werden. Diese Derivate können dann dazu genutzt werden, neue oder modifizierte PPS zu konstruieren, wodurch das von der PPS synthetisierte Peptid an den gewünschten Peptidbindungen N-methyliert ist. Dies ermöglicht die Synthese neuer Peptide mit möglichen, neuen pharmakologischen Eigenschaften. Viele der bereits bekannten pharmakologisch aktiven Peptide und Peptid-Derivate, wie beispielsweise das Cyclosporin, enthalten N-methylierte Aminosäuren. Die durch die Erfindung erreichbare, selektive N-Methylierung einzelner Stickstoffatome in den Peptidbindungen von Polypeptiden, ist durch chemische Methoden kaum oder nicht möglich.

Die Erfindung basiert darauf, daß alle Aktivierungsdomänen mit N-Methyltransferase-Aktivität eine zusätzliche Domäne besitzen, welche zwischen der Adenylierungs-Domäne und ACP-Domäne lokalisiert ist (Abbildung 1 B). Diese zusätzliche Domäne wird im Weiteren als N-Methyltransferase-Domäne bezeichnet und vermittelt die N-Methylierung der gebundenen Substrataminosäure. Die Erfindung beinhaltet Verfahren zur Umwandlung von Aktivierungsdomänen ohne N-Methyltransferase-Aktivität in Aktivierungsdomänen mit N-Methyltransferase-Aktivität und deren Nutzung zur Neukonstruktion von PPS für die Synthese von N-methylierten Aminosäuren und Peptiden. Aktivierungsdomänen ohne N-Methyltransferase-Aktivität einer PPS können prinzipiell durch zwei Wege in Aktivierungsdomänen mit N-Methyltransferase-Aktivität überführt werden:

- (1) Ein ganzes Modul oder die ganze Aktivierungsdomäne einer PPS wird ausgetauscht. Dieses Verfahren ist in Beispiel 2 beschrieben.
- (2) Eine N-Methyltransferase-Domäne wird als funktionelle Einheit in eine Aktivierungsdomäne inseriert. Die N-Methyltransferase-Domäne kann beispielsweise direkt zwischen die Adenylierungs-Domäne und ACP-Domäne der umzuwandelnden Aktivierungsdomäne inseriert werden (Abbildung 2 A). Zur Insertion können auch zwei dicht benachbarte Fusionsstellen genutzt werden. Hierbei wird der zwischen den Fusionsstellen liegende Bereich in der umzuwandelnden Aktivierungsdomäne deletiert und durch entsprechende Bereiche ersetzt, die zusammen mit der N-Methyltransferase-Domäne inseriert werden (Abbildung 2 B). Dieses Verfahren ist in Beispiel 3 beschrieben. Bei der Verwendung von

zwei Fusionsstellen kann die N-Methyltransferase-Domäne auch als Block mit einer nachfolgenden ACP-Domäne (oder Teilen davon) hinter die Aktivierungsdomäne inseriert werden, wodurch es zu einem Austausch der ursprünglichen ACP-Domäne durch die inserierte ACP-Domäne (bzw. Teilen davon) kommt (Abbildung 2C und 2D). Bei allen Insertionen bleibt die Substratspezifität der umgewandelten Aktivierungsdomäne aber erhalten, da die Adenylierungs-Domäne (Erkennung und Adenylierung der Substrataminosäure) nicht verändert wird.

Geeignete Insertionsstellen für die Insertion der N-Methyltransferase-Domäne in eine Aktivierungsdomäne werden durch den Übergang zwischen Adenylierungs-Domäne und ACP-Domäne festgelegt. Diese ergeben sich aus dem Sequenzvergleich zwischen Aktivierungsdomänen mit N-Methyltransferase-Domäne und Aktivierungsdomänen ohne N-Methyltransferase-Domäne (Abbildung 3). Die N-Methyltransferase-Domänen liegen als Einschub etwa 45 Aminosäuren hinter (C-terminal) der als „core motif 5“ bekannten Konsensussequenz QVKIRG(F/H/Y)RIE(L/I)GEIE (Turgay *et al.* (1992) Mol. Microbiol. 6:529-546) der Adenylierungs-Domäne und unmittelbar N-terminal zur Konsensussequenz (Q/E/D) (I/V)REx(V/L)xxxLPXYM(V/I)P.

Alle beschriebenen Methoden zur Umwandlungen einer Aktivierungsdomäne ohne N-Methyltransferase-Aktivität in eine Aktivierungsdomäne mit N-Methyltransferase-Aktivität oder deren Verwendung zur Konstruktion neuer PPS beinhalten eine gezielte Veränderung und Kombination der entsprechenden DNA-Abschnitte von Peptidsynthetase Genen. Hierzu wird der DNA-Abschnitt, welcher für die N-Methyltransferase-Domäne einer beliebigen Aktivierungsdomäne mit N-Methyltransferase-Aktivität kodiert, in das DNA-Segment, welches für die umzuwandelnde Aktivierungsdomäne kodiert, eingefügt. Dies muß in einer Weise geschehen, daß sich nach der Insertion ein gemeinsamer Leserahmen bildet und die kodierte N-Methyltransferase-Domäne integraler Bestandteil der kodierten Aktivierungsdomäne wird. Hierfür kann beispielsweise das DNA-Fragment aus einem Gen einer PPS, welches komplett oder teilweise für die umzuwandelnde Aktivierungsdomäne kodiert, in Plasmiden kloniert werden. Zur Klonierung und Modifikation von DNA können alle gängigen Methoden der Molekularbiologie verwendet werden, wie beispielsweise die Polymerase Kettenreaktion (PCR). Die Klonierungen und DNA-Manipulationen können in allen für diese Zwecke geeigneten Plasmiden und Organismen, wie beispielsweise pUC-Plasmiden und *E.coli*, erfolgen. Bei der Klonierung und Modifikation der DNA können bereits vorhandene oder beispielsweise durch PCR erzeugte Restriktionsschnittstellen genutzt werden. Solche Verfahren sind in Beispiel 1 beschrieben und beinhalten die Einführung einer Restriktionsschnittstelle in die DNA des Gens der Actinomycin Synthetase II. welche dann zum nachfolgenden Modulaustausch genutzt wird.

Durch die Insertion eines für die N-Methyltransferase-Domäne kodierenden DNA-Segments in das Gensegment einer PPS können neue PPS konstruiert werden. Die Expression eines neuen PPS-Gens kann in Plasmiden erfolgen und zur Synthese neuer Produkte führen. Dies ist in Beispiel 4 beschrieben und beinhaltet die Expression eines rekombinanten PPS-Gens nach der

Transformation eines entsprechenden Plasmids in *Streptomyces lividans* und den Nachweis der katalytischen Aktivität der von dem PPS-Gen kodierten PPS. Auch können DNA-Segmente dazu genutzt werden, PPS-Gene in das Genom von Organismen einzuführen oder bereits im Genom vorhandene PPS-Gene zu verändern, wie beispielsweise gezeigt beim Gen der Surfactin Synthetase in *Bacillus subtilis* (Stachelhaus et al. (1995) Science 269(5220):69-72). Entsprechend können daher auch Module mit N-Methyltransferase-Aktivität in genomische PPS-Gene eingebracht werden und zur Bildung neuer, N-methylierter Peptide führen.

Beispiele

Im Folgenden wird das Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung anhand von Beispielen näher beschrieben.

Die bei der Durchführung der Beispiele verwendeten Plasmide (pSP72, pBlueScript, pIJ702, pSPIJ004 und pACM5) sind in Abbildung 4 schematisch gezeigt und in Tabelle 1 näher erläutert.

Die DNA-Sequenzen der bei der PCR verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 2 aufgeführt. Die in den Beispielen angegebenen Größen der PCR-Fragmente beziehen sich auf PCR-Fragmente, deren Enden mit den in den Beispielen genannten Restriktionsenzymen geschnitten wurden. Zusätzliche Restriktionsschnittstellen in den Oligonukleotiden wurden genutzt, um die PCR-Fragmente vor den in den Beispielen geschilderten Klonierungen zuerst in *E.coli*-Standardplasmiden zu klonieren.

Die DNA-Sequenz des Gens der Actinomycin Synthetase II (*acmB*) ist in der Datenbank „GenBank“ unter dem Eintrag AF047717 abgelegt. Die DNA-Sequenz eines 3849 bp *Bam*HI-Fragments aus dem Gen der Actinomycin Synthetase III (*acmC*) ist den Beispielen nachfolgend beigelegt.

Beispiel 1

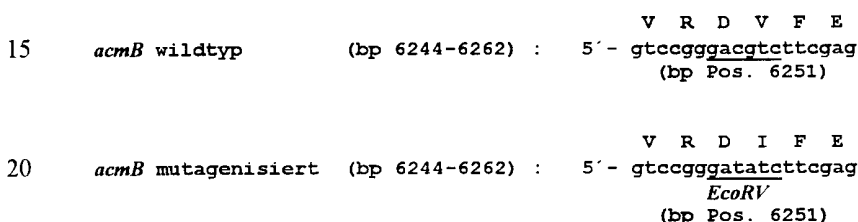
Einführen einer Restriktionsschnittstelle in das Gen der Actinomycin Synthetase II, um einen Austausch einer Aktivierungsdomäne zu ermöglichen.

Die Actinomycin Synthetase II (ACMS II) aus *Streptomyces chrysomallus* besitzt zwei Module ohne N-Methyltransferase-Domäne, von denen Modul 1 die Aminosäure Threonin und Modul 2 die Aminosäure Valin aktiviert. Um die Aktivierungsdomäne von Modul 2 austauschen zu können, wurde durch Mutagenese eine *Eco*RI-Schnittstelle in das Gen der ACMS II (*acmB*) eingeführt. Diese *Eco*RI-Schnittstelle und eine bereits im Gen vorhandene *Cla*I-Schnittstelle ermöglichen es, den für die Aktivierungsdomäne von Modul 2 kodierenden Bereich durch beliebige *Cla*I-

EcoRV-Fragmente auszutauschen. Der Austausch beinhaltet zahlreiche Klonierungsschritte, welche zunächst formal und nachfolgend detailliert beschrieben werden.

1. Formale Zusammenfassung der Klonierungsstrategie:

- 5 Zur Erzeugung einer *EcoRV*-Restriktionschnittstelle in das Gen der ACMS II (*acmB*) wurde das Plasmid pACM5 genutzt (Abbildung 4; Schauwecker *et al.* (1998) J. Bacteriol., 180:2468-2474). Das Plasmid pACM5 (Abbildung 4) trägt das *acmB*-Gen hinter einem konstitutiven Streptomyceten Promotor (*mel P*) und ist ein Derivat des Streptomyceten-Plasmids pIJ702. Durch PCR-Mutagenese und entsprechende Klonierungen wurde eine *EcoRV*-Schnittstelle in das
- 10 *acmB*-Gen hinter den für die Phosphopantethein-Bindungsstelle kodierenden Bereich (in Modul 2) an Basenpaar (bp) Position (Pos.) 6251 eingeführt:



25

2. Detaillierte Beschreibung der einzelnen Klonierungsschritte:

- Zuerst wurde ein 4923 bp *PstI*-*ClaI*-Fragment, welches den *mel*-Promotor und den größten Teil des 5'-gelegenen Bereichs der *acmB* umfaßt (bis zur *ClaI*-Schnittstelle an bp Pos. 4519 in *acmB*) aus pACM5 isoliert und in das *E. coli* Plasmid pSP72 kloniert (A in Abbildung 5). Danach wurde
- 30 ein Teil des direkt anschließenden 3'-Bereiches der *acmB* (beginnend mit der *ClaI*-Schnittstelle an bp 4519) mit den Oligonukleotiden *prim-A* und *prim-B* durch PCR amplifiziert (PCR-Fragment 1 in Abbildung 5) und als 1737 bp *ClaI*-*EcoRV*-Fragment eingefügt (B in Abbildung 5). Die durch *prim-B* eingeführte *EcoRV*-Schnittstelle entspricht bp Pos. 6251 in *acmB*. Die zusammengesetzten Fragmente wurden dann als komplettes *PstI*-*EcoRV*-Fragment isoliert und in pBlueScript
- 35 umklontiert (C in Abbildung 5). Hieraus kann dann der zusammengesetzte 5'-Bereich der *acmB* zur späteren Klonierung als *BamHI*-*EcoRV*-Fragment isoliert werden. Der noch fehlende 3'-Bereich der *acmB* wurde mit den Oligonukleotiden *prim-C* und *prim-D* amplifiziert (PCR-Fragment 2 in Abbildung 5) und als 2583 bp *EcoRV*-*BamHI*-Fragment in pSP72 kloniert (D in Abbildung 5). Das erhaltene Plasmid wurde mit *BglII* und *EcoRV* geschnitten und der 5'-Bereich der *acmB*
- 40 (isoliert als *BamHI*-*EcoRV*-Fragment wie oben beschrieben) eingesetzt. Dies ergibt Plasmid pACM00-A (Abbildung 5), welches das vollständig zusammengesetzte *acmB* Gen mit der an bp Pos. 6251 eingeführten *EcoRV*-Schnittstelle trägt.

45

Beispiel 2

Austausch einer vollständigen Aktivierungsdomäne ohne N-Methyltransferase-Aktivität durch eine Aktivierungsdomäne mit N-Methyltransferase-Aktivität in einer PPS.

Der Austausch einer vollständigen Aktivierungsdomäne wurde in der Actinomycin Synthetase II (ACMS II) aus *Streptomyces chrysomallus* vorgenommen. Die Aktivierungsdomäne von Modul 2 wurde durch eine Aktivierungsdomäne mit N-Methyltransferase-Aktivität ausgetauscht. Die zum Austausch verwendete Aktivierungsdomäne mit N-Methyltransferase-Aktivität stammt aus der Actinomycin Synthetase III (ACMS III) und ist ebenfalls spezifisch für Valin. Der Austausch beinhaltet zahlreiche Klonierungsschritte, welche zunächst formal und nachfolgend detailliert beschrieben werden.

1. Formale Zusammenfassung der Klonierungsstrategie:

Der Bereich zwischen einer in *acmB* liegenden *ClaI*-Schnittstelle an bp Pos. 4519 und einer an bp Pos. 6251 eingeführten *EcoRV*-Schnittstelle (in Plasmid pACM00-A aus Beispiel 1), welcher für die zweite Aktivierungsdomäne der ACMS II kodiert, wurde deletiert und durch ein mit PCR generiertes 2961 bp *ClaI*-*EcoRV*-Fragment ersetzt, welches für eine Aktivierungsdomäne mit N-Methyltransferase-Aktivität der ACMS III mit Spezifität für Valin kodiert. Die Bereiche an den Fusionsstellen (*ClaI* und *EcoRV*) kodieren für in beiden PPS konservierte Regionen, welche N-terminal und C-terminal zu den Aktivierungsdomänen lokalisiert sind. Nach der Insertion des PCR-generierten *ClaI*-*EcoRV*-Fragments in das modifizierte *acmB* Gen entsteht wieder ein durchgehender Leserahmen, welcher für eine rekombinante ACMS II kodiert:

```

25      modifizierte                S R I D V L T          S V R D I F E
      ACMS II                      .. agcgcgtatcgatgctcctcacc.....tccgctccgggacgtctctcgag ..
      (in Plasmid pACM00-A)        Clal                      EcoRV
                                   (bp Pos. 4591)                (bp Pos. 6251)

30      Aktivierungsdomäne          V L T          G L R
      aus der ACMS III             atcgatGTCCTCACC.....GGCCTGCGCgatatc
      (2961 bp PCR-Fragment)       Clal                      EcoRV

35

40      rekombinante                S R I D V L T          G L R D I F E
      ACMS II                      .. agcgcgtatcgatGTCCTCACC.....GGCCTGCGCgatatctctcgag ..
      (in Plasmid pACM00-B)        Clal                      EcoRV
                                   (bp Pos. 4591)                (bp Pos. 7480)

```

Das Gen der rekombinanten ACMS II (in Plasmid pACM00-B, Abbildung 7) wurde in *Streptomyces lividans* transformiert und die enzymatische Aktivität der eingeführten Aktivierungsdomäne nach der Expression des PPS-Gens wie in Beispiel 4 beschrieben nachgewiesen.

2. Detaillierte Beschreibung der einzelnen Klonierungsschritte:

Von einem 3849 bp *Bam*HI-Fragment aus dem Gen der ACMS III (*acmC*, die Sequenz ist beigefügt), welches für eine Valin-Aktivierungsdomäne mit N-Methyltransferase-Domäne kodiert, wurde mit den Oligonukleotiden *prim-E* und *prim-F* durch PCR ein 2967 bp *Cla*I-*Eco*RV-Fragment amplifiziert (PCR-Fragment 4 in Abbildung 6). Dieses *Cla*I-*Eco*RV-Fragment wurde in das Plasmid pACM00-A (aus Beispiel 1) kloniert und hierdurch das ursprünglich in pACM00-A vorhandene *Cla*I-*Eco*RV-Fragment ausgetauscht. Das erhaltene Plasmid wurde mit *Bam*HI und *Hind*III geschnitten und der Streptomyceten-Anteil aus Plasmid pSPIJ004 (Abbildung 4) als 5130 bp *Bgl*II-*Hind*III-Fragment eingesetzt. Hierdurch entsteht das Plasmid pACM00-B (Abbildung 7), welches sowohl in *E.coli* als auch in Streptomyceten transformiert und selektioniert werden kann.

Beispiel 3

15 **Umwandlung einer Aktivierungsdomäne ohne N-Methyltransferase-Aktivität in eine Aktivierungsdomäne mit N-Methyltransferase-Aktivität und Einbringen dieser umgewandelten Aktivierungsdomäne in eine PPS.**

20 In die Valin-Aktivierungsdomäne aus Modul 2 der ACMS II wurde zwischen die Adenylierungs-Domäne und die ACP-Domäne eine zusätzliche N-Methyltransferase-Domäne inseriert. Hierdurch wird die Aktivierungsdomäne der ACMS II mit einer zusätzlichen N-Methyltransferase-Aktivität versehen. Die eingesetzte N-Methyltransferase-Domäne stammt aus Modul 3 der ACMS III. Der Austausch beinhaltet zahlreiche Klonierungsschritte, welche zunächst formal und nachfolgend detailliert beschrieben werden.

25

1. Formale Zusammenfassung der Klonierungsstrategie:

Zur geplanten Insertion der N-Methyltransferase-Domäne wurden zuerst zwei *SnaBI*-Schnittstellen im Gen der *acmB* an bp Pos. 5899 und bp Pos. 5932 durch PCR-Mutagenese eingeführt. Anschließend wurde der zwischen den beiden *SnaBI*-Schnittstellen liegende Bereich von 33 bp deletiert und durch ein 1263 bp *EcoRV*-*EcoRV*-Fragment, welches für die oben genannte N-Methyltransferasedomäne der ACMS III kodiert, ersetzt. Die Ligation der *SnaBI*-Enden mit den *EcoRV*-Enden führt zur Bildung einer mit diesen beiden Restriktionsenzymen nicht mehr spaltbaren DNA-Sequenz an den Fusionsstellen. Nach der Insertion des PCR-generierten *EcoRV*-*EcoRV*-Fragments entsteht bei einer der beiden möglichen Orientierungen wieder ein durchgehender Leserahmen, welcher für eine rekombinante ACMS II kodiert:

40) ACMS II .. R L V A Y V V A D G G T A P D G L R E A L
.. cgctcgtcgccctacgtcgtcgaggacggcggaacggccccggacggtctgcgcgagggccctc ..
(bp Pos. 5899) (bp Pos. 5932)

45 modifizierte R L V A Y V R E A L
ACMS II .. cgctcgtcgcctacgtagtcgaggcgggaacggccccggactacgtacgcgagggccctc ..
SnaBI *SnaBI*
(bp Pos. 5899) (bp Pos. 5932)

5 N-Methylierungs-Domäne I V A D L L T D
aus der ACMS III gatATCGTCGCGGAC.....CTGCTCACCGATatc
(1263 bp PCR-Fragment) *EcoRV* *EcoRV*

10 rekombinante R L V A Y I V A D L L T D V R E A L
ACMS II .. cgcctcgctcgctacATCGTCGCGGAC.....CTGCTCACCGATgtacgcgaggccctc ..
(in Plasmid pACM00-C) (bp Pos. 5899) (bp Pos. 7156)

15 Das Gen der rekombinanten ACMS II (in Plasmid pACM00-C, Abbildung 7) wurde in *Streptomyces lividans* transformiert und die neu eingeführte N-Methyltransferase-Aktivität der rekombinanten PPS wie in Beispiel 4 beschrieben nachgewiesen.

20 2. Detaillierte Beschreibung der einzelnen Klonierungsschritte:

Zur Einführung der *SnaBI*-Schnittstellen wurden der Bereich des *acmB*-Gens von bp Pos. 4591 bis 5899 mit den Oligonukleotiden *prim-G* und *prim-H* (PCR-Fragment 1 in Abbildung 6) sowie der Bereich von bp Pos. 5932 bis 6251 mit den Oligonukleotiden *prim-I* und *prim-J* (PCR-Fragment 2 in Abbildung 6) durch PCR amplifiziert. Danach wurde zuerst das PCR-Fragment 2 als 330 bp *HindIII-EcoRV*-Fragment in pBlueScript kloniert und dann das PCR-Fragment 1 als 1386 bp *ClaI-SnaBI*-Fragment eingesetzt. Hierdurch entsteht ein DNA-Fragment, welches für die fast vollständige Aktivierungsdomäne von Modul 2 der ACMS II kodiert und in welches eine *SnaBI*-Schnittstelle eingeführt wurde (A in Abbildung 6). In diese *SnaBI*-Schnittstelle wurde anschließend ein 1263 bp *EcoRV-EcoRV*-Fragment eingesetzt, welches von einem 3849 *BamHI*-Fragment aus dem Gen der ACMS III (*acmC*, die Sequenz ist beigefügt) durch PCR mit den Oligonukleotiden *prim-K* und *prim-L* amplifiziert wurde (PCR-Fragment 3 in Abbildung 6). Die Orientierung des inserierten *EcoRV-EcoRV*-Fragments, welches für die N-Methyltransferase-Domäne der ACMS III kodiert, wurde mittels DNA-Sequenzierung überprüft. Durch die Fusion der *EcoRV*-Enden mit den *SnaBI*-Enden konnte die zusammengesetzte Aktivierungsdomäne dann komplett als 2961 bp *ClaI-EcoRV*-Fragment isoliert werden und wurde in das Plasmid pACM00-A (aus Beispiel 1) kloniert und hierdurch das ursprünglich in pACM00-A vorhandene *ClaI-EcoRV*-Fragment ausgetauscht. Das erhaltene Plasmid wurde mit *BamHI* und *HindIII* geschnitten und der Streptomyceten-Anteil aus Plasmid pSPIJ004 (Abbildung 4) als 5130 bp *BglII-HindIII*-Fragment eingesetzt. Hierdurch entsteht das Plasmid pACM00-C (Abbildung 7), welches sowohl in *E.coli* als auch in Streptomyceten transformiert und selektioniert werden kann.

Beispiel 4

45 **Expression rekombinanter PPS mit eingeführter N-Methyltransferase-Domäne und *in vitro***
Testung ihrer N-Methyltransferase-Aktivität.

Zur Expression der in den Beispielen 2 und 3 konstruierten PPS-Gene wurden die dort beschriebenen Plasmide pACM00-B und pACM00-C (Abbildung 7) in *Streptomyces lividans*

(Stamm TK64) transformiert. Die Transformation sowie die mikrobielle Kultivierung von Streptomyceten erfolgte nach Standardprotokollen (Hopwood *et al.* (1985) Genetic manipulation of Streptomyces. A laboratory manual. The John Innes Foundation, Norwich, England). Die Reinigung der plasmidkodierten PPS aus den Transformanten erfolgte jeweils aus 1 Liter YEME Kulturmedium nach dem Erreichen der stationären Wachstumsphase (3 Tage Wachstum). Die
5 Reinigung der PPS auf einen für die Analyse notwendigen Reinheitsgrad beruht im wesentlichen auf einem bereits detailliert beschriebenen Protokoll (Schauwecker *et al.* (1998) J. Bacteriol. 180:2468-2474) und wird deshalb im Folgenden nur schematisch erläutert: Zur Freisetzung von Proteinen wurden die Zellen mechanisch aufgebrochen (French-Press). Die ebenfalls
10 freigesetzte genomische DNA wurde durch eine Inkubation mit DNase I gespalten um eine dünnflüssige Suspension zu erhalten. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation entfernt und Proteine anschließend durch Zugabe von Ammoniumsulfat bis zum Erreichen einer Endkonzentration von 55% gefällt. Die gefällten Proteine wurden durch eine
15 Ausschlußchromatographie (Säulenmatrix: Ultrogel-AcA-34 von Biosepra) nach Größe aufgetrennt. Proteinfractionen mit Proteinen einer Größe von mehr als 200 kDa wurden vereinigt und weiter über einen Anionenaustauscher (Säulenmatrix: Q-Sepharose FF von Pharmacia) aufgereinigt. Die an den Anionenaustauscher gebundenen Proteine wurden durch kontinuierliche Zugabe von NaCl vom Anionenaustauscher freigesetzt. Die in den Beispielen 2 und 3 konstruierten PPS eluierten in einem Bereich zwischen 150 bis 250 mM NaCl. Die nach diesem
20 Protokoll partiell gereinigten PPS können dann beispielsweise nach folgenden Vorschriften weiter analysiert werden:

Beispielvorschrift zum *in vitro* Nachweis der spezifischen Erkennung und Bindung von Aminosäuren an eine PPS:

25 100 µl angereinigte PPS werden mit mit 3 µl ¹⁴C-markierter Substrataminosäure (100 µCi/ml), 2 µl MgCl₂ (1 M) und 15 µl ATP (0,1 M) gemischt und für 30 min bei 30°C inkubiert. Die PPS wird durch Zugabe von 2 ml 7% Trichloressigsäure (TCA) gefällt, mit 10 ml 5% TCA gewaschen und die am Enzym gebundene Menge der Substrataminosäure durch Messen der Radioaktivität
30 bestimmt.

Beispielvorschrift zum *in vitro* Nachweis der durch eine PPS katalysierte N-Methylierung von Aminosäuren :

35 Zum Nachweis der N-Methylierungs-Aktivität wird die PPS wie oben beschrieben mit ¹⁴C-markierter Substrataminosäure inkubiert, dem Ansatz aber noch zusätzlich 3 µl 0,1 M S-Adenosyl-Methionin (SAM) als Donor für die auf die Aminosäure übertragene Methylgruppe zugesetzt. Nach der TCA-Fällung wird die PPS mit 4 ml 5% TCA (zwei Portionen) und danach mit 2 ml Ethanol gewaschen und bei 37°C getrocknet. Durch Zugabe von 300 µl
40 Perameisensäure und einer Inkubation für 6 Stunden bei 20 °C wird die als Thioester gebundene Substrataminosäure freigesetzt. Der Ansatz wird anschließend im Vakuum bis zur Trockene

eingengt. Die Aminosäure wird durch Zugabe von 40 µl Ameisensäure gelöst und die Umwandlung in die N-methylierte Form beispielsweise durch chromatographische Methoden nachgewiesen. Für die Umwandlung von Valin in N-Methyl-Valin kann beispielsweise folgendermaßen verfahren werden: 20 µl von der PPS freigesetzten (¹⁴C-markierte) Aminosäure wird parallel mit 5 µl der entsprechenden Referenzen (0,1 M Valin und 0,5 M N-Methyl-Valin) auf einer Kieselgel 60 DC-Folie (Merck) mit dem Laufmittel n-Butanol:Essigsäure:H₂O (Volumen 80:20:20) chromatographiert. Die Aminosäuren werden durch eine Ninhydrinreaktion, und einem Autoradiogramm für die ¹⁴C-markierte Substrataminosäure, sichtbar gemacht.

Beispielvorschrift zum *in vitro* Nachweis der durch eine PPS katalysierten Bildung von Peptiden:

Grundsätzlich kann ein Peptid durch saure Hydrolyse und anschließendem Nachweis der einzelnen Aminosäurekomponenten auf einfachem Wege analysiert werden. Dies trifft besonders auf Peptide zu, welche durch PPS gebildet werden, da die Aminosäuresequenz des synthetisierten Peptids durch die Anordnung der Module bereits bekannt ist. Durch den Einsatz von ¹⁴C-markierten Aminosäuren kann die Analyse des *in vitro* gebildeten Peptids beispielsweise wie folgt durchgeführt werden: 100 µl angereinigte PPS wird mit allen Substrataminosäuren der PPS (jeweils 2 mM), SAM (2 mM), ATP (10 mM) und MgCl₂ (20 mM) in einem Gesamtvolumen von 150 µl für 25 min bei 30°C inkubiert. Gegebenenfalls können der Inkubation auch weitere Enzyme, welche mit der zu testenden PPS zusammenarbeiten, zugesetzt werden (Pfennig *et al.* (1999) JBC 274: 12508-12515). Es werden mehrere Inkubationen parallel angesetzt, wobei sich die Zahl der Ansätze nach der Anzahl der Module in der PPS richtet und in jedem Ansatz die dem Modul entsprechende Aminosäure ¹⁴C-markiert eingesetzt wird. Aus jedem Ansatz wird die PPS wie oben beschrieben mit TCA gefällt, das Syntheseprodukt mit Performsäure abgespalten und das gebildete Peptid nach dem Einengen in Ethanol:Wasser (Volumen 1:1) gelöst und durch chromatographische Methoden nachgewiesen. Zum Nachweis der Threonyl-N-methyl-Valin Peptidverknüpfung durch die in Beispiel 2 und 3 konstruierte PPS kann beispielsweise folgendermaßen verfahren werden: 20 µl des von der PPS freigesetzten Peptids aus jedem Ansatz (ein Ansatz mit ¹⁴C-markiertem Threonin und ein Ansatz mit ¹⁴C-markiertem Valin) werden auf einer Kieselgel 60 DC-Folie (Merk) mit dem Laufmittel n-Butanol:Eisessig:H₂O (Volumen 80:20:20) chromatographiert. Die bei beiden Ansätzen entstehenden Produkte mit identischem R_f-Wert werden durch Extraktion mit Ethanol:Wasser (Volumen 1:1) isoliert, im Vakuum eingengt und die Aminosäuren durch saure Hydrolyse (6 N HCl, 110°C, 20h) aus den Peptiden freigesetzt. Die Identifikation der freigesetzten ¹⁴C-markierten Aminosäuren erfolgt durch erneute Chromatographie auf DC-60 Platten mit dem gleichen Laufmittel. Hierdurch können die Komponenten Threonin und N-Methyl-Valin im gebildeten Peptid nachgewiesen werden. Besteht ferner die Möglichkeit, ein Referenz-Peptid auf chemischen Weg zu synthetisieren, kann dieses direkt mit dem enzymatisch gebildeten und ¹⁴C-markierten Peptid verglichen werden, beispielsweise durch HPLC mit einer zur Trennung von Peptiden geeigneten Säule wie der SuperPac Pep-5 - Säule von Pharmacia.

Tabellen und Abbildungen

Tabelle 1

Verwendete Ausgangsplasmide zur Durchführung der Beispiele

Plasmid	Quelle oder Literaturzitat	Selektion	Beschreibung
pSP72	Promega	Amp	Kommerzieller Klonierungsvektor für <i>E.coli</i> .
pBlueScript	Stratagene	Amp	Kommerzieller Klonierungsvektor für <i>E.coli</i>
plJ702	Katz <i>et al.</i> (1983) J. Gen. Microbiol. 129 : 2703-2714	Tsr	Weit verbreiteter Klonierungsvektor für Streptomyceten. Er trägt die Melanin (<i>mel</i>) Gene <i>melC1</i> und <i>melC2</i> unter Kontrolle ihres Promotors (<i>mel P</i>).
pSPIJ004	Eigenentwicklung	Amp Tsr	Das Plasmid ist eine Kombination aus pSP72 und plJ702 und ist sowohl in <i>E.coli</i> als auch in Streptomyceten replizierbar. Hierzu wurde das <i>PstI-BglII</i> -Fragment aus plJ702 in den Polylinker von pSP72 kloniert.
pACM5	Schauwecker <i>et al.</i> (1998) J. Bacteriol. 180 : 2468-2474	Tsr	Das Plasmid ist ein plJ702-Derivat und trägt das Gen der Actinomycin Synthetase II (<i>acmB</i>) unter Kontrolle des <i>mel</i> -Promotors.

Abkürzungen: Tsr = Thiostrepton; Amp = Ampicillin;

Tabelle 2

Bei den Beispielen verwendete PCR-Oligonukleotide

Oligonukleotid	DNA-Sequenz und Restriktionsschnittstellen
<i>prim</i> - A	5'- gccggaattccgatatcgatgtcctcaccgccgaggaga <i>EcoRI</i> <i>ClaI</i>
<i>prim</i> - B	5'- tgcggaattcgaagatatcccgacggagaaaccgat <i>EcoRI</i> <i>EcoRV</i>
<i>prim</i> - C	5'- tctccgtccggatatcttcgagcagcgacg <i>EcoRV</i>
<i>prim</i> - D	5'- atggcctgagttgctggatcctggcgatcccga <i>BamHI</i>
<i>prim</i> - E	5'- ctccgcatcgatgtcctca <i>ClaI</i>
<i>prim</i> - F	5'- cgcctcgaagatatcgcgaggccca <i>EcoRV</i>
<i>prim</i> - G	5'- gcaggaattcagccgtatcgatgtcctca <i>EcoRI</i> <i>ClaI</i>
<i>prim</i> - H	5'- ttccggaattcgcgactacgtaggcgacga <i>EcoRI</i> <i>SnaBI</i>
<i>prim</i> - I	5'- cggccaagctttacgtacgcgaggccctccggcggcgct <i>HindIII</i> <i>SnaBI</i>
<i>prim</i> - J	5'- tgcggaattcgaagatatcccgacggagaaaccgat <i>EcoRI</i> <i>EcoRV</i>

Nukleotidsequenz des bei der Durchführung der Beispiele verwendeten *Bam*HI-Fragments aus dem *acmC* - Gen

5

Nukleotidsequenz:

Nummerierung:
der Basenpaare

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

70

```

GGATCCACCT GCTCGACACC GCCACCGCCC AACCAGAGCA GCCCCTCAGC CGCATCGACG 0000000060
TCCTCACCCC GGAGGAGAGG AACCGCACGA TCGTCGAGGT CAACCGGACC GAACTGCCGC 0000000120
CGGCCCTGGT CAGCGACGGC GCCACGCTCA GCTACTCCGA GCTCAACACG CGCGCCAACC 0000000180
ACCTCGCCCA CCAGCTCACC ACCCGGGGCA TCCGCCCCGG CGACGCCGTC GCCGTCCTCC 0000000240
TCCAACGCTC CCCCAGACAC GTCAACACCG TCCTCGCCCT CGCCAAGACC GGCAGGACCT 0000000300
ACATCCCCCT CGACAGCCGC TACCCGCGCG ACCGCTACCG CCTCGTCCTC GACGAGACCC 0000000360
GCACCAAACT CCTCATCACC GACCACACCA CCGACCTCGA CACCACCACA ACCCAGTTCA 0000000420
ACCCCGCGGA CACCCCCAC GACGCGGAAG ACCCGGGCAA CCGGAACCAC ACCACCCACC 0000000480
CCGACGACGC CGCCTACATC ATGTACACCA GCGGCTCCAC CGGCCGCCCC AAGGGCGTCA 0000000540
TCGCCACCCA CCGCAACATC ACCGCCCTCG CCCTCGACCC CCGCTTCGAC CCCACGCCCC 0000000600
ACCGCCGCGT CCTCCTCCAC TCCCCACCG CCTTCGACGC CTCCACCTAC GAGATCTGGG 0000000660
TCCCCCTCCT CAACGGCAAC ACCGTCGTCC TCGCCCCCAC CGCGCAGCTC GACGTCCACA 0000000720
CCTACCACCG CGTCATCACC GACCAGCAGA TCACCGCCCT CTGGCTGACC AGCTGGGTCT 0000000780
TCACCTCCTT CACCGAGCAG AGCCCGGAGA CCTTCACCG GGTCCGGCAG ATCTGGACCG 0000000840
GCGGCGAGGC CGTCTCCGGC GCCACCGTCA CCGGCTTCA GCAGGCATGC CCCGACACCA 0000000900
CCGTGGTCTG CGGCTACGGC CCCACCGAGA CCACACCTT CGCCACCCAC CACCCCGTCC 0000000960
CCACCCCTTA CACCGGCTCC GCGGTCGTCC CCATCGGCCG CCCCATGGCC ACCATGCACA 0000001020
CCTACGTGCT CGACGACATC CTCGAGCCCG TCGCCCCCGG CGTCACCGGC GAGCTCTACC 0000001080
TCGCTGGCAG CGGCCTCGCC CGCGGCTACC TGGACCGCCC CGCCCTCACC GCCGAACGCT 0000001140
TCGTCGCCAA CCCGTACGCC GCACCCGGAG AACGCATGTA CCGCACCGGC GACCTGGCAC 0000001200
GCTGGAACCC CGACGACCAC CTCGAGTACG CCGGCCGCGC CGACCAACCAG GTCAAGGTCC 0000001260
GCGGCTTCCG CATCGAACC GCGGAGATCG AGAACGTCTT CACCGACCAT CCCGCCGTCT 0000001320
CCGAGGCCGC CGTCCACCTC AACCGGGACC AGCCCGGCAA CCCCCGGCTC GTCCGCTACG 0000001380
GGCAGGACCT CTACGACTCC CTCTACGCGG CCCCCACGGC CGAGTTCGGC GAGGACTTCT 0000001440
CCGGCTGGAA CAGCAGCTAC GACGCGCGGC CGATCCCCCT CGACCAGATG CGGGAGTGGC 0000001500
GCGACGCCAC CGTGGAAACG ATCCGCGGCC TCAACCCCGG CCGGGTGCTG GAGATCGGGC 0000001560
TCGGCACGGG CCTGCTGCTC GCGAAGCTGG CCGCGAGTAC CGAGGAGTAC TGGGGCACCG 0000001620
ACCTCTCGCC CACCGTGATC GAGGCGCTCT CCGGCACGCT CGACGCCGAC CCGGAGCTGG 0000001680
CCCGGCGGGT CACCTGCGG GCGGCTGCGC CGCAGGAGCA CGAGGGGCTG CCCGTGCGCC 0000001740
ACTTCGACAC CGTCGTGCTC AACTCCGTGG TCCAGTACTT CCGGAACGCC GACTACCTCG 0000001800
CCCAGGTCAT CGAGCAGGCG CTGCGGCTGC TGGCCCCCGG CGCGCGCGTG TTCATCGGCG 0000001860
ACATCCGCAA CCGCGGCTG CTGCGCACCT TCACCACCGC CGTCCAGACC GCCCGCGCGG 0000001920
AGGACCCGCG CGACACCGCC GCGGTCGCGC GCGCGCTCGA GCAGAGCCTG GTGCTGGAGA 0000001980
AGGAACCTCT GGTGACCCCG GAGTACTTCA CCGCGCTCAC CCACCGCCTC CCGGACCTCG 0000002040
CCGGCGTCCA CTGCGGCTC AAGTGCGGTG CCGCCACCAA CGAGTTGACC CGCTACCGCT 0000002100
ACGACACCAC GCTCCACAAG GCCGGAATCA CCGCGCTCCC GCTGTCCGAG GCGCGCGTCC 0000002160
TGGCTTGGCC GCAGGACGCC GAGGCACTCG CCGCGACCTT GCGCGAGGCC CCGCCGGAGC 0000002220
GGCTGCGCGT CACCGGCGCG CCCAACTCCC GGATAGCCCG CGACCTCGCG GCCCAGCAGC 0000002280
CCCTGGAGTC CGGCACCGCC CCGGCCGGGC CCGGACCGGG GCGCTACGCC ACGGAGCAGC 0000002340
CGGACCTCGA GGCACTCCAC CGCCTCGGGG AGGACACCGG GTACTGGAGC GCGGTACCTT 0000002400
GGTCCGCCCA CCGCCCCGAC ACCGTCGACC TCACCTTCGT CCGGCGCGGC CTGCTCGAGC 0000002460
GCGCCGTCCC GGTGCGGTAC TACGCCCCGG CCGCGCGCGG CGACCCGGCG ACGCCGCTCA 0000002520
CCGCCTTCAC CACCAACCCC GTGCGGAGCC GGGGCACCGC CGCGCTGCTC ACCCGGCTGC 0000002580
GCGAACACGC CGCCGCCCAA CTGCCCCACT ACATGCGGCC CGCCGCAATC GTCCCGCTCG 0000002640
ACCGCTGCCC GCTCACCGCC AACGGCAAGC TCGACCGGGC CGCCCTCCCG GCACTCGACC 0000002700
CGGAGCACGC GGACACCGGC CGCGCCCCCA GGACGCCGCA GGAGCAGGTG GTCTGCGAGC 0000002760
TGTTTCGCGA GGTGCTCGGC CCGCGGCTCG TCGGTGTGGA CCAGGACTTC TTCGACCTCG 0000002820
GCGGGCACTC GCTGCTCGCC ACCCGGCTGA TCGCCCGGCT GCGCGCGGCT TTCGCGGTGG 0000002880
AACTGGGCTT GCGCAGCCTC TTGAGGCGCG CGAGCCCGGG CGGGATCGCC GCCCGGCTGG 0000002940
ACCTCGACGA CCGGACCGGC TCCTACGAGG TGGTGTGTC GCTGCGCGCC CAGGGCAGCA 0000003000
GGCCGCGGCT GTTCTGCATC CACCCCGGTG GCGGCATCAG CTGGTCGTAC AGCGCGCTGA 0000003060
TCAAGCACTT CGGCCCGGAG TACCCGCTGT ACGGCATCCA GCGCGCGCAG CTGGCCCGGC 0000003120
CGGAGCCGCG CCGCGAGAGC ATCGAGGAGA TGGCGGTGGA CTACGCGGAC CAGATCCAGG 0000003180
GCGTGCAGCC GCACGGCCCC TACCACCTGG CCGGCTGGTC GTTCGGCGGG CTGTGCGCCC 0000003240
ATGCCCTGGC CGCGGAGTTC CAGCGGCGCG GCGAGCGCGT GCGGCTGGTC GCGGTGCTCG 0000003300
ATGTGATCCC GAACTGGCAG GGGCTCACC ACAGACAGCT CCGCGCCCCC GACGACCGGG 0000003360
TGATGCTGCT GTACCAAGTC GGCTGTGTC ACAGACAGCA CCACCGCAAC GACCGCGAAG 0000003420
AGCTGACCTT CGCCAGGGCC CCGGAGATCC TCGCGGCCCA GGGCAGTGTG CTGCGCAACC 0000003480
TGGAGGAGGA CCGGCTCACC ACGATCAGCG AGATCTCGGC CAACAACACC CATCTGACCG 0000003540
TCGACTACCA GCGCGGCCCC ATCGACGGCG ACCTGTGCT GATCGCGGCC TCGGAACAGC 0000003600
AGGACCCGCC GGTCAACGCC GGCCTGTGCT CTGCGGCGCG GTGAGGCCCC 0000003660
ACGTGCTGCC CCGCGAGCAC GGCTCCATGC TGACCGGGCC CGGCACCTG GCCGAGATCG 0000003720
GCGGATCC 0000003780
0000003840

```

75

Abbildung 1: zeigt den schematischen, modularen Aufbau von PPS und die Unterteilung in funktionelle Domänen.

- 5 Abbildung 2: zeigt die Modifikation von Aktivierungsdomänen durch Insertion einer N-Methyltransferase-Domäne.

Abbildung 3: zeigt den Sequenzvergleich von ausgewählten Aktivierungsdomänen im Bereich der Übergänge zu N-Methyltransferase-Domänen.

10

Abbildung 4: zeigt die in den Beispielen verwendeten Ausgangsplasmide.

Abbildung 5: zeigt die Einführung einer *EcoRV*-Restriktionsschnittstelle in *acmB*.

- 15 Abbildung 6: zeigt die Klonierung von *ClaI-EcoRV*-Kassetten für die Konstruktion rekombinanter *acmB*-Gene.

Abbildung 7: zeigt Plasmide zur Expression der rekombinanten PPS-Gene.

20

Patentansprüche

5

1. Verfahren zur Einführung von N-Methyltransferase-Domänen in PPS-Aktivierungsdomänen durch gezielte Veränderung und Kombination der entsprechenden DNA-Abschnitte von Polypeptidsynthetase-Genen, dadurch gekennzeichnet, daß man einen für die N-Methyltransferase-Aktivität einer beliebigen Aktivierungsdomäne mit N-Methyltransferase-Aktivität kodierenden DNA-Abschnitt als integralen Bestandteil in ein DNA-Segment, das für die umzuwandelnde Aktivierungsdomäne kodiert, einfügt oder dieses DNA-Segment insgesamt gegen einen beliebigen Aktivierungsdomäne mit N-Methylierungsdomäne kodierenden DNA-Abschnitt austauscht.

15

2. Verfahren zur Herstellung von Polypeptidsynthetasen mit N-Methyltransferase-Aktivität, dadurch gekennzeichnet, daß man in Polypeptidsynthetase-Genen einen für die N-Methyltransferase-Aktivität einer beliebigen Aktivierungsdomäne mit N-Methyltransferase-Aktivität kodierenden DNA-Abschnitt als integralen Bestandteil in ein DNA-Segment, das für die umzuwandelnde Aktivierungsdomäne kodiert, einfügt oder dieses DNA-Segment insgesamt gegen einen beliebigen Aktivierungsdomäne mit N-Methyltransferase-Aktivität kodierenden DNA-Abschnitt austauscht, das neue Gen in geeigneten Systemen transformiert und die rekombinante Polypeptidsynthetase exprimiert.

25

3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das für die N-Methyltransferase-Domäne kodierende DNA-Fragment zusammen mit DNA-Linker-Sequenzen inseriert wird.

30

4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß bei der Insertion der DNA-Sequenz, welche für eine N-Methyltransferase-Domäne kodiert, gleichzeitig auch DNA-Sequenzen verändert werden, welche für die ACP-Domäne oder Aktivierungs-Domäne oder Kondensationsdomäne kodieren.

5. Verwendung der nach Anspruch 1 und den Ansprüchen 3-4 hergestellten DNA-Sequenzen für die Veränderung natürlicher PPS-Gene, bereits veränderter PPS-Gene oder Teilen davon, sowie die Verwendung zur Neukonstruktion von PPS-Genen oder Teilen davon.

5

6. Verwendung der nach Anspruch 1 und den Ansprüchen 3-5 hergestellten DNA-Sequenzen für die Veränderung natürlicher Gene von Polyketidsynthetasen (PKS), bereits veränderten PKS-Genen oder Teilen davon, sowie die Verwendung zur Neukonstruktion von PKS-Genen oder Teilen davon.

10

7. Verwendung der nach Anspruch 1 und den Ansprüchen 3-6 hergestellten DNA-Sequenzen für die Konstruktion von Plasmiden und genetisch veränderten Organismen zur Synthese der durch die DNA-Sequenzen kodierten Proteine.

15

8. Verwendung der nach Anspruch 7 hergestellten Proteine zur enzymatischen *in vivo* und *in vitro* Synthese von Aminosäuren, Polypeptiden und Peptidyl-Acetyl-Mischstrukturen, welche N-methylierte Aminosäuren oder deren Derivate enthalten.

20

9. Verwendung der nach Anspruch 7 hergestellten Proteine zur fermentativen Synthese von Aminosäuren, Polypeptiden und Peptidyl-Acetyl-Mischstrukturen, welche N-methylierte Aminosäuren oder deren Derivate enthalten, wobei die Fermentation sowohl mit als auch ohne Zufütterung von Aminosäuren, Acetaten oder anderen organischen Zwischenprodukten erfolgen kann.

25

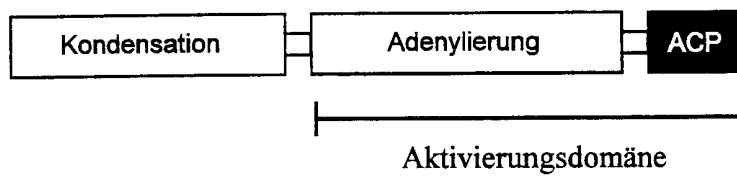
10. Polypeptidsynthetasen, deren Aktivierungsdomänen ohne N-Methyltransferase-Aktivität ganz oder teilweise in Aktivierungsdomänen mit N-Methyltransferase-Aktivität umgewandelt worden sind.

30

35

Abbildung 1: Modul einer PPS und Unterteilung in funktionelle Domänen

A: Minimal-Modul einer PPS



B: Modul mit N-Methyltransferase-Domäne

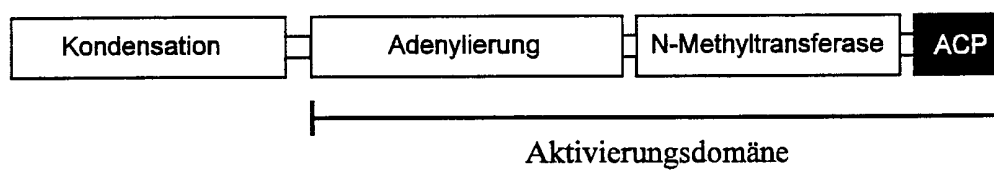


Abbildung 2: Umwandlung von Aktivierungsdomänen durch Insertion einer N-Methyltransferase-Domäne

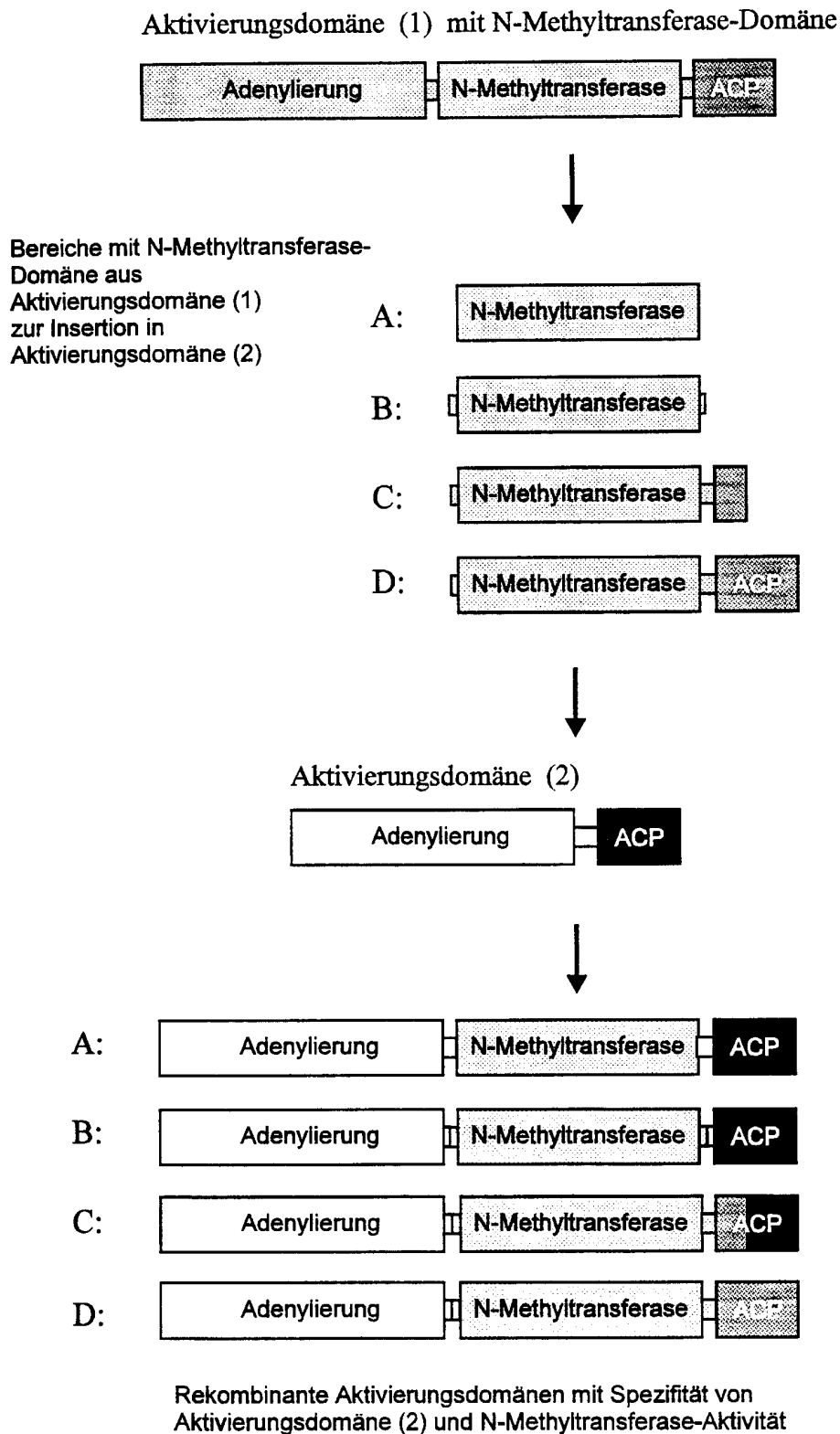
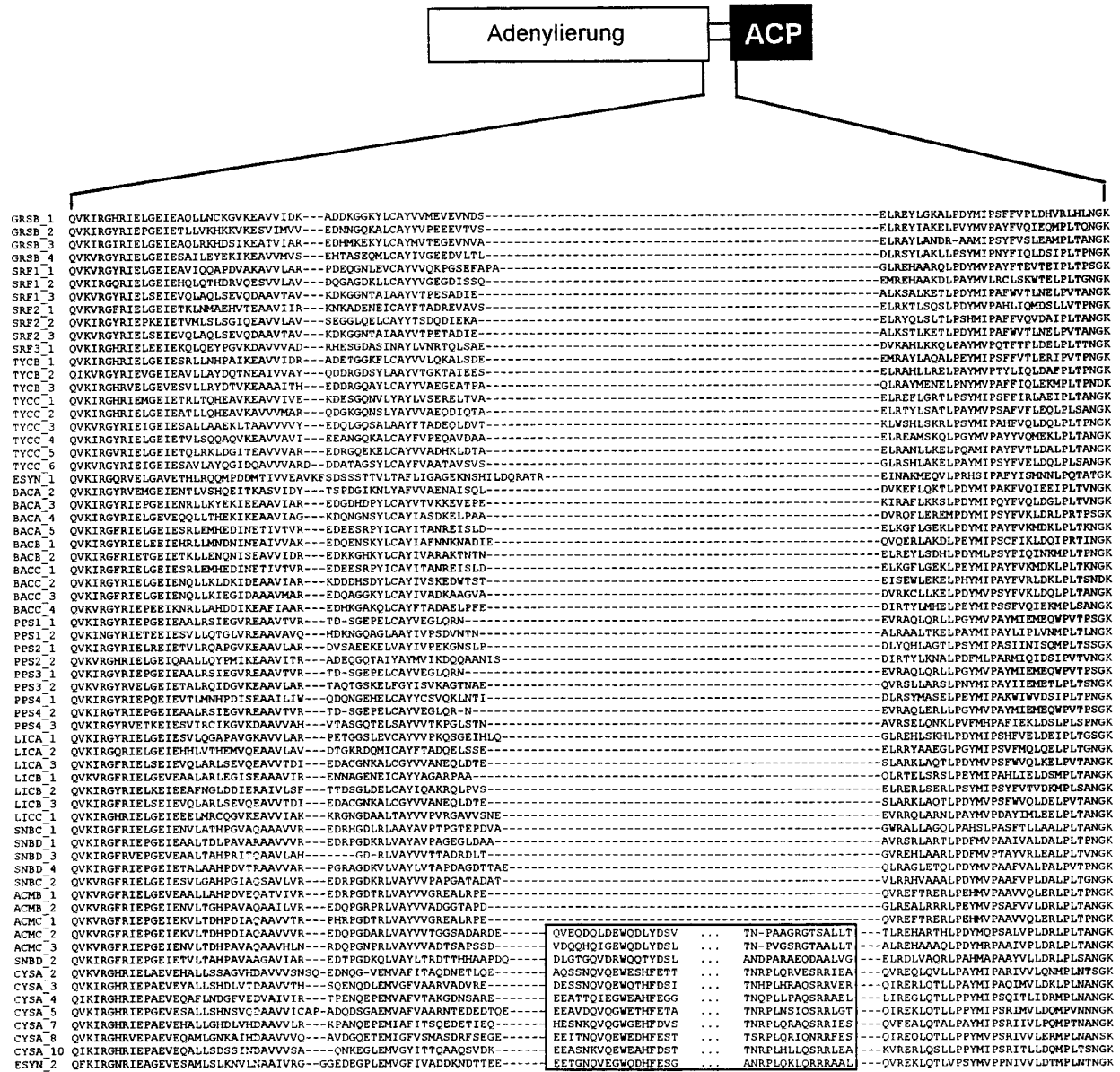


Abbildung 3: Sequenzvergleich von ausgewählten Aktivierungsdomänen im Bereich der Übergänge zu N-Methyltransferase-Domänen.



core motif 5

CYS A	Cyclosporine Synthetase aus <i>Tolypocladium niveum</i> (Z23838)
GRS A,B	Gramicidin S Synthetase I,II aus <i>Bacillus brevis</i> (P14687 / P14688)
ACM B,C	Actinomycin Synthetase II,III aus <i>Streptomyces chrysomallus</i> (AF047717 und beiliegende Sequenz)
BAC A,B,C	Bacitracin Synthetase A,B,C aus <i>Bacillus licheniformis</i> (AF007865)
TYC A,B,C	Tyrocidin Synthetase I,II,III aus <i>Bacillus brevis</i> (AF004835)
LIC A,B,C	Lichemycin Synthetase A,B,C aus <i>Bacillus licheniformis</i> (U95370)
ESYN	Enniatin Synthetase aus <i>Fusarium scirpi</i> (Z18755 : Update Jahr 2000)
SNB C,D	Pristinamycin I Synthetase C,D aus <i>Streptomyces pristinaespiralis</i> (Q54959, X98690)
SRF 1,2,3	Surfactin Synthetase 1,2,3 aus <i>Bacillus subtilis</i> (P27206, Q04747, Q08787)
PPS 1,2,3,4	Fengycin Synthetase 1,2,3,4 aus <i>Bacillus subtilis</i> (Z34883)

Der dem Namen folgende Index bezeichnet die Nummer der Aktivierungsdomäne innerhalb der jeweiligen PPS (gezählt vom N-Terminus). Die Datenbanknummern der Sequenzen in „GenBank“ oder „SwissProt“ sind in Klammern angegeben.

N-Methyltransferase-Domänen

(Sequenzausschnitt an den N-terminalen und C-terminalen Enden der Domänen)

Konsensus am Übergang:

QIREXVxxxLPxYMVP
EV L I
D

Abbildung 4: Ausgangsplasmide zur Konstruktion der Beispiele

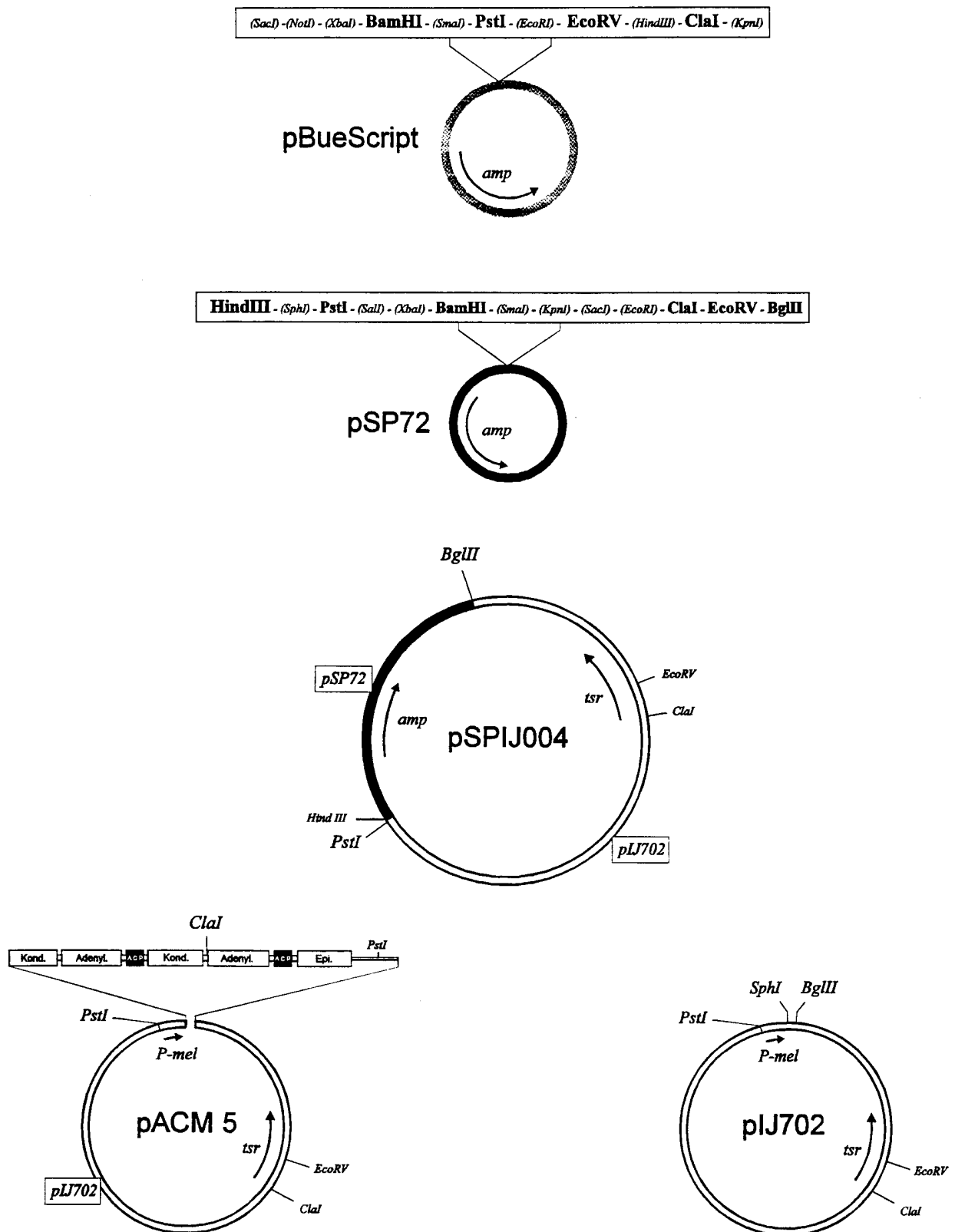


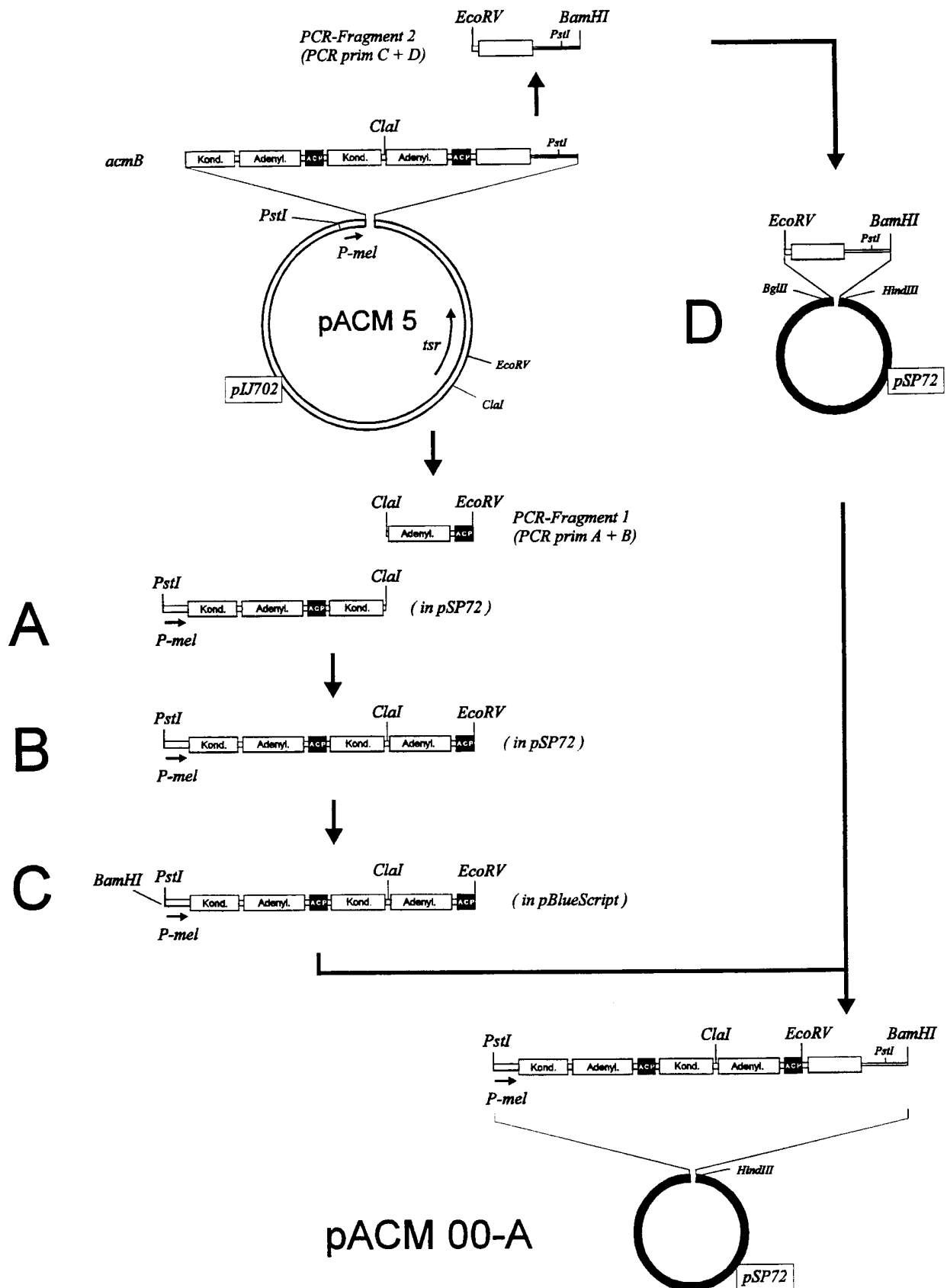
Abbildung 5 : Einführen einer *EcoRV*-Restriktionsschnittstelle in *acmB*

Abbildung 6 : Klonierung von *ClaI*-*EcoRV*-Kassetten für die Konstruktion rekombinanter *acmB*-Gene

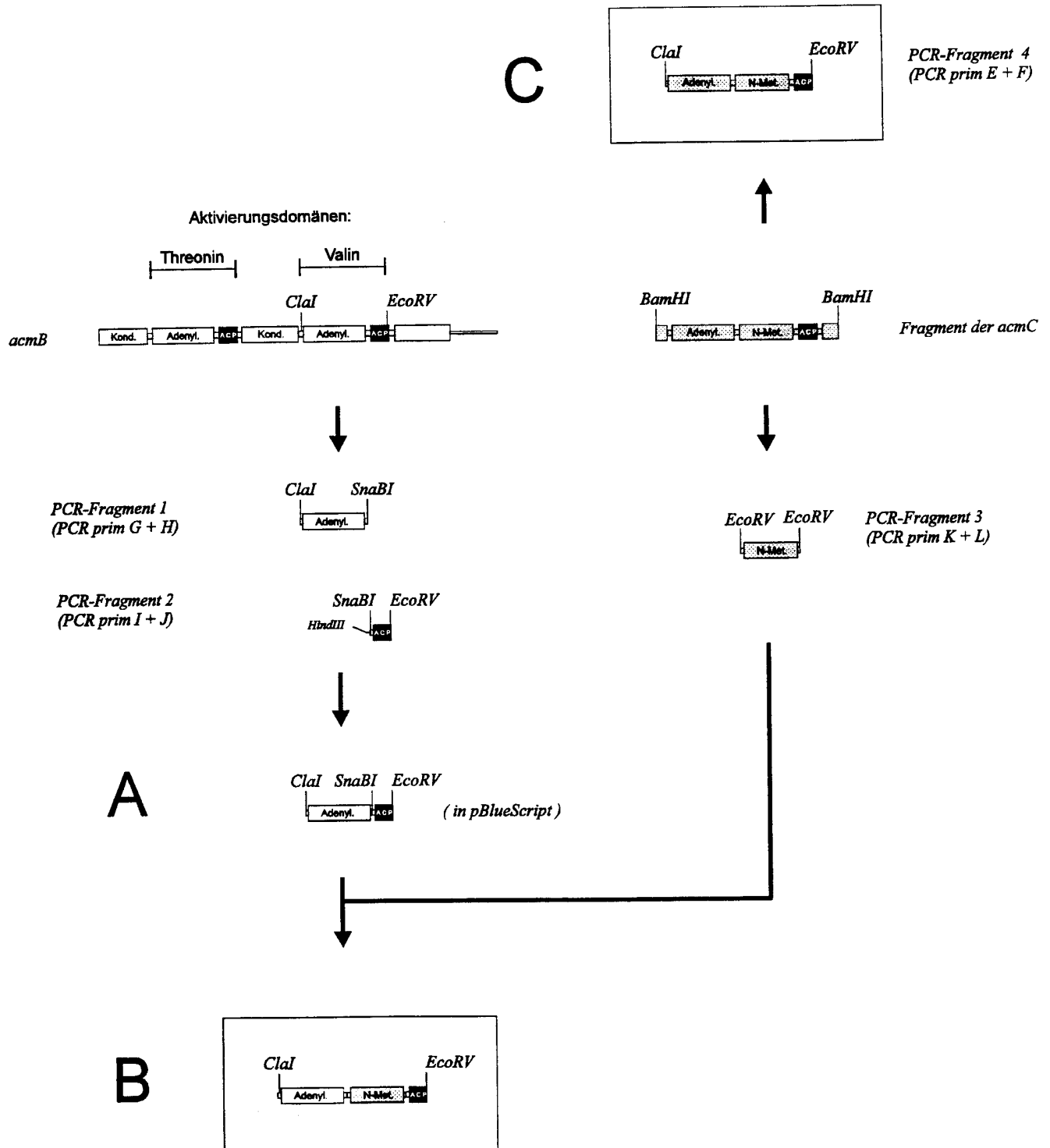


Abbildung 7 : Plasmide zur Expression der rekombinanten PPS-Gene

